

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

und aus dem

Comprehensive Pneumology Center

des Helmholtz Zentrums München

Kommissarische Leitung: Dr. Antje Brand

**Interleukin-1-abhängige Interleukin-22-Sekretion von  
T-Helfer Zellen im Bronchial- und Mammakarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Cornelia Voigt

aus

Hanau

2017

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter:**

Prof. Dr. med. Stefan Endres

**Mitberichterstatter:**

Prof. Dr. med. Tobias Rüttinger

Prof. Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei

**Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:**

PD Dr. med. Sebastian Kobold

**Dekan:**

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2017**

**Meiner Familie gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>Summary .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>1 Einleitung.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Bildung und Signaltransduktion von Interleukin-22 (IL-22) .....                  | 1           |
| 1.1.1 Zelluläre Quellen von IL-22 .....  | 1           |
| 1.1.2 Die Signaltransduktion von IL-22 .....   | 7           |
| 1.2 Effekte von IL-22 .....  | 9           |
| 1.2.1 Physiologische Effekte von IL-22 .....   | 9           |
| 1.2.2 Pathophysiologische Rolle von IL-22 während Infektionen und Inflammation ..... | 11          |
| 1.3 Rolle von IL-22 in Tumorerkrankungen .....                                       | 12          |
| 1.3.1 Effekt von IL-22 auf die Tumorentstehung und Progression .....                 | 12          |
| 1.3.2 IL-22-produzierende Lymphozyten in Tumor und Blut von Patienten .....          | 14          |
| 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit .....   | 17          |
| <b>2 Materialien.....</b>  | <b>18</b>   |
| 2.1 Chemikalien und Reagenzien .....   | 18          |
| 2.2 Gebrauchs und Verbrauchsmaterialien.....   | 18          |
| 2.3 Geräte .....   | 19          |
| 2.4 Puffer und Lösungen .....  | 19          |
| 2.5 Antikörper.....  | 20          |
| 2.6 Kits und Assays.....   | 20          |
| 2.7 Enzyme .....   | 21          |
| 2.8 qRT-PCR Primer .....   | 21          |
| 2.9 Zelllinien, Zusätze und Medium .....   | 21          |
| 2.9.1 Zusätze und Grundmedien.....   | 21          |
| 2.9.2 Zellkulturmedium .....   | 22          |
| 2.9.3 Zelllinien .....   | 22          |
| 2.10 Zytokine und Stimulanzen .....  | 23          |
| 2.11 Software .....  | 23          |
| <b>3 Methoden .....</b>  | <b>24</b>   |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden.....   | 24          |
| 3.1.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription .....                                  | 24          |
| 3.1.2 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR).....                                       | 24          |
| 3.2 Zellbiologische Methoden .....   | 26          |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.1 Kultivierung der Zelllinien .....  | 26        |
| 3.2.2 Isolation von Splenozyten .....  | 26        |
| 3.2.3 Isolation von Tumor- und Lungenzellen .....  | 26        |
| 3.2.4 Isolation von PBMCs .....  | 27        |
| 3.2.5 Isolation von Lymphozyten aus Mamma- und Bronchialkarzinomen .....   | 27        |
| 3.2.6 Zellstimulation .....  | 27        |
| 3.3 Durchflusszytometrie .....   | 28        |
| 3.4 Tierexperimentelle Methoden .....  | 28        |
| 3.4.1 Tierhaltung .....  | 28        |
| 3.4.2 Subkutanes Tumormodell .....   | 29        |
| 3.4.3 Organentnahme .....  | 29        |
| 3.5 Patientenkollektiv mit Bronchialkarzinom .....   | 30        |
| 3.6 Statistische Auswertungsverfahren .....  | 31        |
| <b>4 Ergebnisse .....</b>  | <b>32</b> |
| 4.1 Untersuchungen zur Rolle von IL-1 $\alpha$ in der durch Lungen- und Brusttumorzelllinien<br>vermittelten IL-22-Induktion aus Splenozyten .....                             | 32        |
| 4.1.1 IL-22-Expression von Lymphozyten in 4T1 und Line-1 Tumoren <i>in vivo</i> .....  | 32        |
| 4.1.2 Stimulation von Splenozyten mit IL-1 $\alpha$ und IL-23 .....  | 33        |
| 4.1.3 Expression der Zytokine IL-1 $\alpha$ und IL-23 in den Tumorzelllinien Line-1 und 4T1 .....  | 33        |
| 4.1.4 Neutralisation von IL-1 $\alpha$ und IL-23 führt zu einer Reduktion der IL-22-Expression .....   | 34        |
| 4.1.5 Einfluss des IL-1-Signalwegs auf die IL-22-Induktion .....   | 35        |
| 4.2 Die Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t sind für die Tumorzell-induzierte<br>IL-22-Produktion verantwortlich .....   | 36        |
| 4.2.1 Einfluss der Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t auf die IL-22-Sekretion nach<br>Stimulation von Splenozyten mit Tumorüberstand .....                          | 36        |
| 4.2.2 Die IL-22-Sekretion von Immunzellen ist <i>in vivo</i> vom Transkriptionsfaktor AhR abhängig<br>.....  | 37        |
| 4.3 Murine Tumorzellen induzieren die IL-22-Sekretion aus einer gemischten T-Helfer<br>Zellpopulation .....  | 40        |
| 4.3.1 IL-22 wird von CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Tumorzellüberstand und<br>rekombinanten Zytokinen sezerniert .....   | 40        |
| 4.3.2 Die IL-22-Produktion von T-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem IL-1 $\alpha$ und IL-23<br>ist von den Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t abhängig ..... | 40        |
| 4.3.3 IL-22-Sekretion durch eine gemischte CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Population .....  | 41        |
| 4.3.4 Die IL-17 und IFN $\gamma$ Sekretion aus Th1, Th17 und Th22 -Zellen ist von IL-1 abhängig .....  | 42        |
| 4.3.5 Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulationen <i>in vivo</i> .....  | 43        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4 Humane Lungen- und Brusttumorzelllinien induzieren IL-22-Sekretion von PBMCs, in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und den Transkriptionsfaktoren AhR- und ROR $\gamma$ t ..... | 44        |
| 4.4.1 Lösliche Faktoren aus humanen Lungen- und Brusttumorzellen können IL-22-Sekretion aus PBMCs initiieren .....  | 44        |
| 4.4.2 Die IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Tumorzellüberständen ist von IL-1 $\beta$ abhängig .....  | 44        |
| 4.4.3 Die IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Tumorzellüberständen ist von AhR- und ROR $\gamma$ t abhängig.....  | 47        |
| 4.5. Humane Brust und Lungentumorzelllinien induzieren IL-22 aus einer gemischten T-Helfer Zellpopulation.....  | 49        |
| 4.5.1 Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulation nach Stimulation mit humanem Tumorzellüberstand.....   | 49        |
| 4.5.2 IL-17 und IFN $\gamma$ Sekretion von T-Helfer Zellen durch Stimulation mit Tumorzellüberstand .....   | 50        |
| 4.6 T-Helfer Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-22 in primärem Lungentumorgewebe .....   | 52        |
| 4.6.1 Identifikation der IL-22-exprimierenden Zellen im Tumor von Patienten mit Bronchialkarzinom.....  | 52        |
| <b>5 Diskussion .....</b>   | <b>54</b> |
| 5.1 Die IL-22-Produktion von murinen Splenozyten wird über IL-1 $\alpha$ und IL-23 induziert.....   | 54        |
| 5.2 Die IL-22-Produktion von PBMCs wird über lösliche Faktoren von humanen Brust- und Lungentumorzellen induziert.....  | 55        |
| 5.3 Tumorzellen induzieren IL-22-Sekretion aus CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....   | 56        |
| 5.4 Die Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t sind für die Tumorzell-induzierte IL-22-Produktion verantwortlich .....   | 57        |
| 5.5 T-Helfer-Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-22 in primärem Lungentumorgewebe .....   | 58        |
| 5.6 Zusammenfassung und Ausblick .....  | 59        |
| <b>6 Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>7 Anhang.....</b>  | <b>83</b> |
| 7.1 Abkürzungen .....   | 83        |
| 7.4 Publikationen.....  | 86        |
| 7.4.1 Original Publikationen .....  | 86        |
| 7.4.2 Vorträge.....   | 86        |
| 7.4.3 Poster Präsentationen.....  | 86        |
| 7.5 Danksagung .....  | 87        |
| 7.6 Curriculum Vitae.....   | 89        |

## Zusammenfassung

Interleukin-22 (IL-22) wird von verschiedenen Immunzellen ausgeschüttet und wirkt ausschließlich auf IL-22 Rezeptor (IL-22-R1) positive nicht-hämatopoetische Zellen. In mehreren retrospektiven Studien konnte eine positive Korrelation von IL-22-Expression in Immunzellen mit der Prognose von Tumorerkrankungen festgestellt werden. Der Mechanismus, welcher zu einer IL-22-Produktion im Tumorgewebe führt ist bis heute noch nicht identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher murine Splenozyten und humane PBMCs von gesunden Donoren mit Überständen von verschiedenen murinen und humanen Brust- und Lungentumorzellen kultiviert. Die IL-22-, IL-17- und IFN- $\gamma$ -Produktion wurde mittels ELISA und spezifische Immunzell-Populationen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für *in-vivo*-Experimente wurden Mäusen subkutane Tumore mit Zellen der murinen Brustkrebszelllinie 4T1 und der murinen Lungenkrebszelllinie Line-1 induziert. Primäres Lungentumorgewebe von Patienten wurde mittels Durchflusszytometrie und ELISA analysiert.

Die Untersuchungen zeigen, dass murine und humane Brust- und Lungentumorzellen die Sekretion von IL-22 durch Immunzellen über lösliche Faktoren induzieren können. Dabei war die IL-22-Induktion in der Maus von IL-1 $\alpha$  und in humanen Zellen von IL-1 $\beta$ , sowie von der Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t abhängig. Über IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  konnte eine IL-22-Sekretion durch Zellen eines gemischten T-Helfer-Phänotyps, bestehend aus Th1-, Th17- und Th22-Zellen, induziert werden. Die Existenz dieser IL-22-produzierenden Zellpopulationen konnte in primärem Lungentumorgewebe (n = 15) bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit einen zuvor unbekannten Mechanismus über den Tumorzellen IL-22 in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  direkt von CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren können. Diese Befunde klären die Regulation von IL-22 in der Tumorumgebung weiter auf. Sie könnten die Basis für zukünftige IL-22-gerichtete therapeutische Maßnahmen darstellen.

## Summary

Interleukin-22 (IL-22) is expressed by different immune cells and acts exclusively on IL-22 receptor (IL-22R-1) positive epithelial cells. IL-22 expression in immune cells correlates with tumor progression in almost all cancer entities analyzed so far. However, the mechanism, which leads to IL-22 production in different cancer entities, has not yet been identified. In this study, murine splenocytes or human PBMCs from healthy donors were stimulated with supernatants of different murine and human breast and lung cancer cells. IL-22, IL-17 and IFN- $\gamma$  production was analyzed by ELISA and specific immune cell populations by flow cytometry. Subcutaneous tumors induced with the murine breast cancer cell line 4T1 or the murine lung cancer cell line Line-1 were studied for *in vivo* effects. Primary lung cancer tissue from patients was analyzed by flow cytometry and ELISA.

This study showed that soluble factors of murine and human breast and lung cancer cells can induce IL-22 secretion from immune cells. IL-1 $\alpha$  in mice and IL-1 $\beta$  in human samples were the main mediators of IL-22 induction, which was dependent on the activity of the transcription factors AhR and ROR $\gamma$ t. IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  could induce IL-22 secretion in a mixed CD4-T helper population consisting of Th1, Th17 and Th22 cells. In primary lung cancer samples (n = 15) similar IL-22 producing immune cell populations could be found, consistent with the *in vitro* results.

Taken together this thesis reveals a previously unknown mechanism by which tumor cells induce IL-22 secretion from CD4<sup>+</sup> T cells in an IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , respectively, dependent manner. These results provide insights into IL-22 regulation in the tumor environment and may provide the rationale for future IL-22-directed therapeutic interventions.



# 1 Einleitung

## 1.1 Bildung und Signaltransduktion von Interleukin-22 (IL-22)

### 1.1.1 Zelluläre Quellen von IL-22

Zytokine gehören zu einer Gruppe kleiner Proteine (5 bis 20 kDa), die in der Signalweiterleitung zwischen Immunzellen involviert sind. Sie spielen eine essenzielle Rolle in der Zellproliferation, Differenzierung und Mobilität, sowie in der Abwehr gegen pathogene und maligne Zellen. Interleukin-22 (IL-22) ist ein Mitglied der Interleukin-10-Zytokinfamilie und nimmt eine kritische Rolle in der Modulation von Gewebeantworten während der Inflammation ein (Wolk *et al.*, 2010). Zur IL-10-Familie gehören neben IL-22 auch IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28  $\alpha$  und  $\beta$ , sowie IL-29 (Ouyang *et al.*, 2011). IL-22 wurde erstmals 2000, als ein sezerniertes  $\alpha$ -helikales Protein in IL-9 stimulierten murinen BW5147 T-Lymphom-Zelllinien und Concanavalin A aktivierten Splenozyten beschrieben (Dumoutier *et al.*, 2000).

IL-22 wird von verschiedenen Lymphozytenpopulationen des angeborenen und erworbenen Immunsystems produziert. Darunter sind T-Zellen und deren T-Helfer-Zell (Th) Subgruppen (Th1, Th17, Th22,  $\gamma\delta$  T-Zellen), sowie Natürliche Killer (NK) -Zellen, *lymphoid tissue-inducer* (LTi) Zellen und LTi-like Zellen, wichtige Quellen von IL-22 (Zenewicz and Flavell 2011). Die Ausschüttung des Zytokins ist auf Leukozyten beschränkt, während dessen Rezeptor ausschließlich auf Epithelzellen exprimiert wird (Liang *et al.*, 2006).

Die Produktion von IL-22 durch angeborene und adaptive lymphoide Zellen spielt in der Immunabwehr des Wirts gegen Hefen und Bakterien an den Körperbarrieren in Haut, Lunge und intestinalem Trakt eine wichtige Rolle (Basu *et al.*, 2012). Außerdem ist es in die Gewebemöostase, Gewebereparatur und Wundheilung involviert. Die Funktion von IL-22 ist daher vom Kontext seiner Induktion, sowie von dessen Lokalisation abhängig (Rutz *et al.*, 2013).

Die erste identifizierte IL-22-produzierende T-Zell-Subpopulation, waren Th1 Zellen. Diese differenzieren in Gegenwart von IL-12, sowie in Abhängigkeit von T-bet und dem *signal transducer and activator of transcription* (STAT4) und exprimieren das Effektorzytokin IFN- $\gamma$  (Szabo *et al.*, 2000). In humanem peripherem Blut sind Th1 Zellen eine der Hauptproduzenten von IL-22, während sie in der Maus nur wenig IL-22 ausschütten (Wolk *et al.*, 2002). In humanen Th1 Zellen kann IL-12 direkt oder synergistisch mit IL-18 eine starke

IL-22-Produktion induzieren (Gurney 2004). Währenddessen können IL-12 und IL-23 die IL-22-Expression in murinen Th1 Zellen fördern (Behrends *et al.*, 2013).

In der Maus sind Th17 Zellen, welche IL-17A und IL-17F produzieren, die Hauptquelle von IL-22 (Liang *et al.*, 2006). In humanem peripherem Blut co-exprimieren dahingegen nur 10 bis 18 % der IL-22-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch IL-17 (Duhon *et al.*, 2009). Durch Stimulation mit IL-1 $\beta$ , IL-6, und *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) können sich naive T-Zellen zu IL-17 produzierenden Th17 Zellen ausdifferenzieren (Ivanov *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2008b). IL-21 und IL-23 können deren Differenzierung weiterhin fördern und erhalten (Witte *et al.*, 2010). Mit Ausnahme von TGF $\beta$  und IL-21 fördern alle genannten Zytokine die IL-22-Expression von T-Zellen (Zheng *et al.*, 2007, Rutz *et al.*, 2013, Ikeda *et al.*, 2014). Für die Th17 Differenzierung sind in Maus und Mensch der Transkriptionsfaktor *retinoic acid-related orphan receptor*  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) notwendig (Ivanov *et al.*, 2006, Manel *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008a, Crome *et al.*, 2010). Die IL-22-Expression wird hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) gesteuert (Veldhoen *et al.*, 2008). Des Weiteren fördert die Notch-Signalweiterleitung in Mäusen die Expression von endogenen AhR-Liganden, welche zu einer verstärkten IL-22 Antwort führen (Alam *et al.*, 2010). Über die Stimulation mit IL-6, IL-23 und IL-1 $\beta$  können *in vitro* IL-17 und IL-22-produzierende Th17 Zellen generiert werden (Ghoreschi *et al.*, 2010).

Die Mehrzahl der IL-22-produzierenden Th-Zellen in humanem peripherem Blut exprimieren weder IL-17 noch IFN $\gamma$ . Diese neu beschriebene Th-Subpopulation „Th22“ exprimiert kein T-bet und nur eine geringe Menge an ROR $\gamma$ t (Duhon *et al.*, 2009, Trifari *et al.*, 2009). Über eine Stimulation mit IL-6 und TNF $\alpha$  können sich Th22 Zellen differenzieren und über Vitamin D kann deren IL-22-Produktion noch weiter erhöht werden (Fujita *et al.*, 2009). Wie schon bei Th17 Zellen beschrieben, ist der AhR ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression von IL-22 (Trifari *et al.*, 2009). *Ex vivo* Studien konnten in der Maus eine ähnliche Zellpopulation beschreiben, welche ausgehend von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über IL-6 Stimulation in Abwesenheit von TGF $\beta$  und in Abhängigkeit des AhR, viel IL-22 und kein IL-17 produziert (Basu *et al.*, 2012). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IL-21 die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche IL-22 aber kein IL-17 produzieren in Abhängigkeit des AhR induzieren kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AhR, ROR $\gamma$ t und STAT3 bei der Differenzierung zu Th22 Zellen eine wichtige Rolle spielen (Yeste *et al.*, 2014).

Außerdem konnten Subpopulationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben werden, welche entweder IL-17 und IL-22 (Tc17) oder nur IL-22 (Tc22) exprimieren. Die Differenzierung von naiven humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Tc22 Zellen kann durch IL-21 induziert werden, welches

die Phosphorylierung von STAT1, 3 und 5 bewirkt und somit die IL-22-Expression fördert. Wiederum hemmt TGF $\beta$  die IL-22-Expression, induziert aber gleichzeitig die IL-17 Sekretion von Tc22 Zellen (Liu *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von murinen Tc17 Zellen, ähnlich den Th17 Zellen über IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$  und IL-21 gesteuert wird. Letzteres aktiviert die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4. Die IL-22-Expression wird über IL-6 und IL-23 induziert und ist von STAT1 und STAT4 abhängig (Ciric *et al.*, 2009, Hayes *et al.*, 2014). Tc17 und Tc22 Zellen sind in der Haut von Psoriasis Patienten stark in ihrer Frequenz erhöht und tragen zur Pathogenese dieser Erkrankung bei (Res *et al.*, 2010, Eysteinsdottir *et al.*, 2013).

Kürzlich wurden innate T-Zell Populationen als IL-22-Produzenten identifiziert. Darunter  $\gamma\delta$  T-Zellen, eine Untergruppe von T-Zellen welche den  $\gamma\delta$ -TCR exprimieren (Ness-Schwickerath *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren diese den IL-23 Rezeptor (IL-23R) konstitutiv und können sofort auf eine IL-23 Stimulation mit Expression von IL-17A und IL-22 reagieren (Martin *et al.*, 2009). Durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-23 können  $\gamma\delta$  T-Zellen in Mäusen ohne Beteiligung des T-Zell Rezeptors IL-17, IL-21 und IL-22 ausschütten und exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (Sutton *et al.*, 2009). Ähnlich den Th17 und Th22 Zellen ist der AhR ein wichtiger Transkriptionsfaktor für IL-22, nicht aber für IL-17A (Martin *et al.*, 2009). IL-22 exprimierende  $\gamma\delta$  T-Zellen sind hauptsächlich in der pulmonalen Immunantwort wichtig (Simonian *et al.*, 2010). Im Menschen konnten IL-17 (T $\gamma\delta$ 17) und IL-22 (T $\gamma\delta$ 22) sezernierende  $\gamma\delta$  T-Zellpopulationen identifiziert werden. IL-1 $\beta$ , IL-23, und TGF $\beta$  sind für die Differenzierung zu  $\gamma\delta$  T-Zellen notwendig (Ness-Schwickerath *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte vor kurzem eine neue Subpopulation an IL-17 und IL-22-produzierenden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> *tissue resident* Zellen beschrieben werden. Diese exprimieren beide Zytokine in Abhängigkeit von IL-23 an der Schnittstelle zwischen Knochen und Sehnen (Sherlock *et al.*, 2012).

Eine weitere T-Zell-Subpopulation des angeborenen Immunsystems sind NKT-Zellen, welche Rezeptoren von NK- und T-Zellen exprimieren, sowie IL-17 und IL-22 produzieren können. Der Transkriptionsfaktor T-bet reguliert die terminale Reifung und Homöostase der NKT Zellen (Townsend *et al.*, 2004). Nach Isolation von NKT Zellen aus Splenozyten und deren *in vitro* Stimulation mit CD3, CD3 und IL-2 oder CD3 und CD28 schütten diese IL-17 und IL-22 aus. Zugabe von IL-6 und TGF- $\beta$  zu CD3 und CD28 stimulierten Splenozyten reduziert die IL-22 nicht aber die IL-17 Expression (Goto *et al.*, 2009). In ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> invarianten NKT (iNKT) Zellen konnte gezeigt werden, dass in Folge einer IL-1 $\beta$  und IL-23 Stimulation IL-17 und IL-22 produziert werden, wobei dies von der TCR-CD1d Interaktion abhängig war (Doisne *et al.*, 2011). Werden humane iNKT Zellen mit IL-1 $\beta$  und IL-23

stimuliert, schütten diese IL-17 und IL-22 aus. Die IL-22 aber nicht die IL-17 Expression ist vom Transkriptionsfaktor AhR abhängig (Moreira-Teixeira *et al.*, 2011).

Innate lymphoide Zellen (ILCs) sind die Hauptproduzenten von IL-22 im intestinalen Trakt. Diese heterogene Familie umfasst Zellen des angeborenen Immunsystems, die morphologisch Lymphozyten ähnlich sind, aber keine antigenspezifischen Rezeptoren tragen. ILCs werden nach ihrer Fähigkeit Th1, Th2 oder Th17-Zell assoziierte Zytokine zu produzieren, sowie nach der Expression von Schlüssel-Transkriptionsfaktoren, in ILC Gruppe 1 bis 3 eingeteilt (Walker *et al.*, 2013). NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, RORγt<sup>+</sup>) werden der ILC Gruppe 1 zugeordnet. Ihre Differenzierung ist von den Transkriptionsfaktoren T-bet und Esodermin (EOMES) abhängig (Townsend *et al.*, 2004, Gordon *et al.*, 2012). Aus Blut isolierte humane NK-Zellen können über eine IL-12 Stimulation IL-22 exprimieren (Wolk *et al.*, 2002). Des Weiteren können IL-12, IL-18 und IL-23 die IL-22-Sekretion aus NK-Zellen in der Maus fördern (Zenewicz *et al.*, 2008, Guo and Topham 2010). Humane immature NK-Zellen (iNK-Zellen) exprimieren den IL-1 Rezeptor-1 und aktivieren über eine IL-1β Stimulation den AhR, welcher für eine IL-22 Ausschüttung aus diesen Zellen notwendig ist (Hughes *et al.*, 2010). ILCs der Gruppe 3 (ILC3) können nach ihrer Funktion in LT<sub>i</sub> und LT<sub>i</sub>-like Zellen eingeteilt werden. LT<sub>i</sub>-like ILC3 bestehen wiederum aus Untergruppen, darunter *natural cytotoxicity triggering receptor* negative (NCR<sup>-</sup>) und NCR<sup>+</sup> (auch unter dem Namen NK22-Zellen bekannt) Zellen. LT<sub>i</sub> Zellen sezernieren IL-17 und IL-22, NCR<sup>+</sup> (Nkp46<sup>+</sup>) ILC3 ausschließlich IL-22 und NCR<sup>-</sup> (Nkp46<sup>-</sup>) ILC3 IL-22, IL-17 und IFNγ. Humane NCR<sup>-</sup> ILC3 können kein IL-22 ausschütten (Rankin *et al.*, 2013, Spits *et al.*, 2013). Die Differenzierung der IL-22 und IL-17 produzierenden Gruppe 3 ILCs ist von RORγt abhängig und IL-22 kann über IL-23 induziert werden (Takatori *et al.*, 2009, Sonnenberg *et al.*, 2011b, Qiu *et al.*, 2012, Glatzer *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2013, Ward and Umetsu 2014). Im Fall der ILC3 NCR<sup>-</sup> ILCs ist eine IL-22 Ausschüttung weiterhin über eine Stimulation mit IL-1α beschrieben (Hernandez *et al.*, 2015). Humane NCR<sup>+</sup> und murine NCR<sup>-</sup> ILC3 können IL-22 durch Stimulation mit IL-1β ausschütten (Cella *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2011, Glatzer *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2013). Die Expansion und das Überleben der murinen LT<sub>i</sub> und NCR<sup>+</sup> ILC3, sowie die Expression von IL-22 in allen ILC3 scheint von AhR abhängig zu sein (Kiss *et al.*, 2011, Qiu *et al.*, 2012).

In einer durch Natrium-Dextransulfat ausgelöste Kolitis, werden Neutrophile (CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>) angelockt, welche IL-22 freisetzen können. Dieser Prozess wird durch IL-23, sowie den Transkriptionsfaktor RORγt reguliert und durch TNFα weiter verstärkt (Zindl *et al.*, 2013).

Dendritische Zellen (DC) können IL-22 in der frühen Phase der Wirtsabwehr, während einer *C. rodentium* Infektion in Mäusen, exprimieren. Diese Expression ist IL-23 abhängig und konnte auch in humanen DCs nachgewiesen werden (Zheng *et al.*, 2008). Bei akuter Kolitis waren DCs die Hauptquelle von IL-22, welche über Toll-like-Rezeptor (TLR) Liganden und IL-23 aktiviert wurden (Pickert *et al.*, 2009). Intra-renale DCs und Makrophagen konnten in einer Arbeit als Hauptquelle für IL-22 identifiziert werden (Kulkarni *et al.*, 2014). Außerdem konnten humane und murine alveolare Makrophagen über eine IL-23 Stimulation IL-22 ausschütten (Hansson *et al.*, 2013). In Patienten mit rheumatoider Arthritis waren auch Fibroblasten in der Lage IL-22 zu produzieren (Ikeuchi *et al.*, 2005).

*Retinoic acid* (RA) ist in der Lage die IL-22-Expression zu regulieren, welches von  $\gamma\delta$  T-Zellen und innatens lymphoiden Zellen während intestinaler Entzündungen ausgeschüttet wird. RA erhöht *in vitro* die IL-22-Produktion nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder IL-18 und IL-23. Es konnte gezeigt werden, dass RA an dessen Rezeptor bindet, welcher sich wiederum an den IL-22 Promotor anlagern kann und so die IL-22-Expression in  $\gamma\delta$  T-Zellen fördert (Mielke *et al.*, 2013).

In nachfolgender Tabelle 1 sind die wichtigsten zellulären Quellen von IL-22 mit den dazugehörigen Transkriptionsfaktoren, sowie die zur Induktion benötigten Zytokine zusammengefasst.

**Tabelle 1: Zelluläre Quellen von IL-22 in Mensch und Maus**

| Zelltyp     | Zell-spezifische TFs  | TF zur IL-22-Produktion   | Zytokine zur Induktion der IL-22-Produktion   | Spezies |
|-------------|---|---|---|---------|
| <b>Th1</b>  | T-bet, STAT4<br>(Szabo <i>et al.</i> , 2000),<br>(Wolk <i>et al.</i> , 2002)    | nicht bekannt   | IL-12, IL-23<br>(Behrends <i>et al.</i> , 2013)   | Maus    |
|             |   |   | IL-12, IL-18<br>(Gurney 2004)   | Human   |
| <b>Th17</b> | ROR $\gamma$ t<br>(Ivanov <i>et al.</i> , 2006)<br>(Yang <i>et al.</i> , 2008)  | AhR, Notch<br>(Veldhoen <i>et al.</i> , 2008),<br>(Alam <i>et al.</i> , 2010) | IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23<br>(Zheng <i>et al.</i> , 2007),<br>(Ikeda <i>et al.</i> , 2014) | Maus    |
|             | ROR $\gamma$ t<br>(Manel <i>et al.</i> , 2008)<br>(Crome <i>et al.</i> , 2010), | AhR<br>(Veldhoen <i>et al.</i> , 2008)  |   | Human   |

|  |   |   |   |       |
|--|---|---|---|-------|
| <b>Th22</b>                                  | AhR, ROR $\gamma$ t, STAT3<br>(Yeste <i>et al.</i> , 2014)                              | AhR<br>(Trifari <i>et al.</i> , 2009),<br>(Basu <i>et al.</i> , 2012) | IL-6, IL-21<br>(Basu <i>et al.</i> , 2012)<br>(Yeste <i>et al.</i> , 2014)  | Maus  |
|  | nicht bekannt   |   | TNF $\alpha$ , IL-6<br>(Fujita <i>et al.</i> , 2009)  | Human |
| <b>Tc17</b>                                  | STAT1, STAT4<br>(Ciric <i>et al.</i> , 2009)  | STAT1, STAT4<br>(Ciric <i>et al.</i> , 2009)                          | IL-6, IL-23<br>(Ciric <i>et al.</i> , 2009)   | Maus  |
|  | nicht bekannt   |   |   | Human |
| <b>Tc22</b>                                  | nicht bekannt   |   |   | Maus  |
|  | STAT1, 3 und 5<br>(Liu <i>et al.</i> , 2011).   | STAT1, 3, 5<br>(Liu <i>et al.</i> , 2011)                             | IL-21<br>(Liu <i>et al.</i> , 2011)   | Human |
| <b><math>\gamma\delta</math>T<br/>Zellen</b> | nicht bekannt   | AhR<br>(Martin <i>et al.</i> , 2009)                                  | IL-1 $\beta$ , IL-23<br>(Sutton <i>et al.</i> , 2009)   | Maus  |
|  |   | nicht bekannt   | IL-23<br>(Sherlock <i>et al.</i> , 2012)  | Human |
| <b>NKT</b>                                   | T-bet<br>(Townsend <i>et al.</i> ,<br>2004)   | nicht bekannt   | CD3, CD28, IL-2, IL-1 $\beta$ ,<br>IL-23<br>(Goto <i>et al.</i> , 2009)   | Maus  |
|  |   | AhR<br>(Moreira-Teixeira <i>et al.</i> , 2011)                        | IL-1 $\beta$ , IL-23<br>(Moreira-Teixeira <i>et al.</i> ,<br>2011)  | Human |
| <b>NK-<br/>Zellen</b>                        | T-bet, EOMES<br>(Gordon <i>et al.</i> , 2012)   | nicht bekannt   | IL-12, IL-18, IL-23<br>(Zenewicz <i>et al.</i> , 2008),<br>(Guo and Topham <i>et al.</i> ,<br>2010)                   | Maus  |
|  | T-bet<br>(Townsend <i>et al.</i> ,<br>2004)   | AhR<br>(Hughes <i>et al.</i> , 2010)                                  | IL-1 $\beta$ , IL-12<br>(Wolk <i>et al.</i> , 2002)   | Human |
| <b>NCR<sup>+</sup><br/>ILC3</b>              | ROR $\gamma$ t, AhR<br>(Glatzer <i>et al.</i> ,<br>2013),<br>(Lee <i>et al.</i> , 2012) | AhR<br>(Qiu <i>et al.</i> , 2011)<br>(Kiss <i>et al.</i> , 2011)      | IL-23<br>(Ward and Umetsu,<br>2014)   | Maus  |
|  | ROR $\gamma$ t<br>(Glatzer <i>et al.</i> , 2013)  |   | IL-1 $\beta$ , IL-23<br>(Cella <i>et al.</i> , 2010),<br>(Cella <i>et al.</i> , 2009),<br>(Tang <i>et al.</i> , 2011) | Human |

|                                 |   |  |  |       |
|---------------------------------|---|--|--|-------|
| <b>NCR<sup>+</sup><br/>ILC3</b> | ROR $\gamma$ t<br>(Lee <i>et al.</i> , 2013)      | AhR<br>(Qiu <i>et al.</i> , 2011)              | IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23<br>(Hernandez <i>et al.</i> , 2015), (Lee <i>et al.</i> , 2013) | Maus  |
| <b>LTi<br/>Zellen</b>           | ROR $\gamma$ t, AhR<br>(Qiu <i>et al.</i> , 2011) | AhR<br>(Qiu <i>et al.</i> , 2011)              | IL-23<br>(Takatori <i>et al.</i> , 2009),<br>(Sonnenberg <i>et al.</i> , 2011)                       | Maus  |
|                                 | ROR $\gamma$ t<br>(Crellin <i>et al.</i> , 2010)  | nicht bekannt                                  | IL-23<br>Crellin <i>et al.</i> , 2010  | Human |
| <b>Neutro-<br/>phile</b>        | Gfi-1<br>(Zindl <i>et al.</i> , 2013)             | ROR $\gamma$ t<br>(Zindl <i>et al.</i> , 2013) | IL-23, TNF $\alpha$<br>(Zindl <i>et al.</i> , 2013)  | Maus  |
| <b>DCs</b>                      | nicht bekannt                                     | nicht bekannt                                  | IL-23<br>(Hansson <i>et al.</i> , 2013).   | Maus  |
|                                 |   |  |  | Human |

### 1.1.2 Die Signaltransduktion von IL-22

IL-22 wird hauptsächlich von Immunzellen sezerniert, sein Rezeptor wird aber selektiv auf epithelialen Zellen, nicht-hematopoietischen Ursprungs exprimiert (Wolk *et al.*, 2002). IL-22 vermittelt seine zellulären Effekte über einen heterodimeren Rezeptor-Komplex, bestehend aus der IL-22-Rezeptor A1 (IL-22-R1) und der IL-10-Rezeptor  $\beta$  R2 (IL-10-R2) Untereinheit (Xie *et al.*, 2000). IL-22-R1 wird hauptsächlich in Organen der äußeren Barrieren wie Haut, Lunge und gastrointestinalem Trakt exprimiert (Wolk *et al.*, 2004). Bis heute konnte der funktionale Rezeptor für IL-22 auf epithelialen Zellen der Haut (Boniface *et al.*, 2005), der Leber (Radaeva *et al.*, 2004), des Pankreas (Aggarwal *et al.*, 2001), der Niere (Kulkarni *et al.*, 2014), der Lunge (Aujla *et al.*, 2008) und des Kolons (Nagalakshmi *et al.*, 2004) detektiert werden. Da die Expression von IL-10R2 ubiquitär ist, wird die Wirkung von IL-22 durch den IL-22-R1 bestimmt (Gurney, 2004).

Die Kombination von IL-10-R2 und IL-22-R1 vermittelt eine spezifische IL-22-Signaltransduktion. Beide Untereinheiten des Rezeptorkomplexes werden auch mit anderen Zytokinen der IL-10-Familie geteilt. Die IL-10-R2 Untereinheit ist für die Signalweiterleitung von IL-10 (mit IL-10-R1), IL-26 (mit IL-20-R1), sowie IL-28 und IL-29 (mit IL-28-R1) verantwortlich (Ouyang *et al.*, 2011, Sabat *et al.*, 2013). Die Untereinheiten IL-22-R1 und IL-20-R2 können zu einem Rezeptor-Komplex assoziieren, wodurch eine Bindung von IL-20 und IL-24 möglich wird (Dumoutier *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2002).

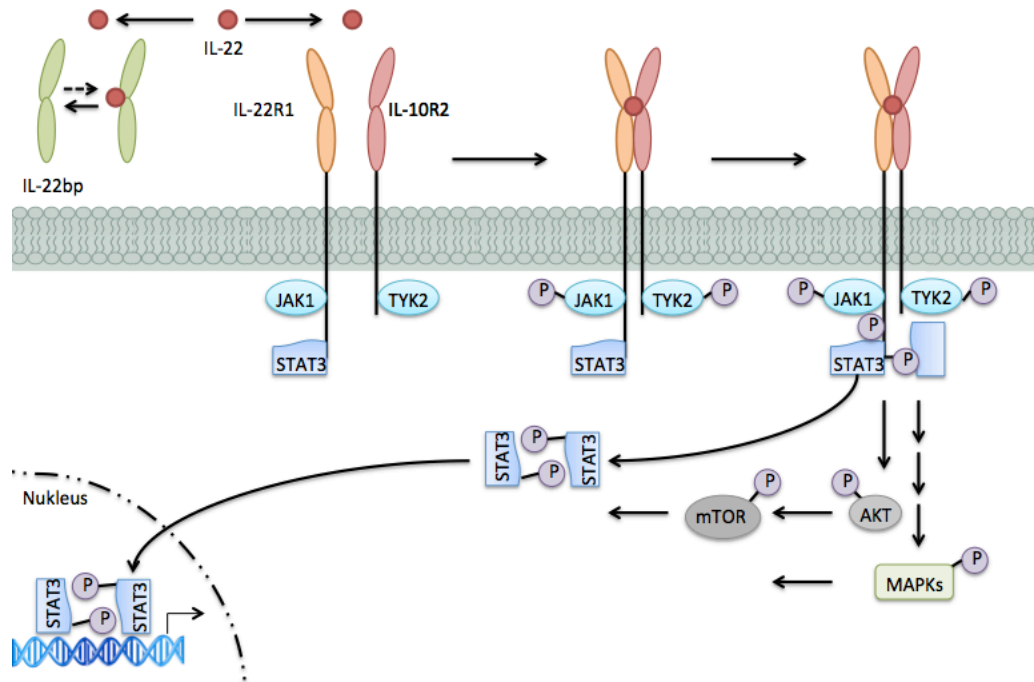
Die Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor wird über die extrazelluläre Domäne der IL-22-R1-Untereinheit vermittelt, welche eine hohe Affinität ( $K_d \sim 1 - 20 \text{ nM}$ ) zu IL-22 aufweist. Die IL-22-R2-Untereinheit hingegen besitzt keine Affinität gegenüber IL-22, hat jedoch eine messbare Affinität ( $K_d \sim 7 - 45 \text{ }\mu\text{M}$ ) gegenüber dem IL-22 - IL-22-R2-Komplex (Logsdon *et al.*, 2002, Logsdon *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2008, Yoon *et al.*, 2010). Die Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor kann als zweistufiger Prozess beschrieben werden (siehe Abbildung 1). Zunächst bindet IL-22 an seine hoch-affine Rezeptoruntereinheit IL-22-R1 wodurch eine Konformationsänderung des IL-22-Proteins stattfindet und eine Bindung an den IL-22-R2 ermöglicht. Die Anlagerung der IL-10-R2 Rezeptoruntereinheit stabilisiert anschließend den IL-22 - IL-22-R2 Komplex und initiiert den intrazellulären Signalweg (Wolk *et al.*, 2010).

Primär läuft die Signalweiterleitung von IL-22 über die Janus Kinase (JAK) und STAT Moleküle (Lejeune *et al.*, 2002). Der zytoplasmatische Teil der IL-22-R1 Untereinheit ist mit JAK1 assoziiert, während die IL-10-R2 Untereinheit mit der Tyrosin Kinase 2 (TYK2) verbunden ist. Nachdem sich der IL-22-Rezeptorkomplex formiert hat, werden Jak1 und TYK2 phosphoryliert und aktiviert. Anschließend werden STAT Moleküle phosphoryliert, was ihre Dimerisierung und Translokation in den Nukleus, sowie die Bindung an bestimmte Abschnitte (DNA bindende Elemente) der DNA bewirkt (Sabat *et al.*, 2013). Die meisten Studien über die induzierte Signalweiterleitung, in Zellen mit endogener Rezeptorexpression, zeigten eine Phosphorylierung von STAT3 (Wolk *et al.*, 2010). Eine STAT1 und STAT5 Aktivierung über IL-22 konnte nur in Hepatozyten und Nierenzellen beobachtet werden (Wolk *et al.*, 2004, Brand *et al.*, 2007). Zusätzlich zum JAK-STAT Signalweg kann die IL-22-Signalweiterleitung über eine Aktivierung der mitogen aktivierenden Protein Kinase (MAPK) oder des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) - AKT- *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Signalwegs gesteuert werden (Lejeune *et al.*, 2002, Mitra *et al.*, 2012).

Das Zytokin IL-22 kann durch das IL-22 *binding* Protein (bp) neutralisiert werden. Dieser lösliche IL-22-Rezeptor besitzt keine transmembrane und intrazelluläre Domäne (Witte *et al.*, 2010, Sonnenberg *et al.*, 2011a). IL-22bp bindet spezifisch an IL-22, aber nicht an andere Mitglieder der IL-10 Familie und verhindert die Bindung von IL-22 an membrangebundenen IL-22-R1 (Dumoutier *et al.*, 2001, Kotenko *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2001, Wei *et al.*, 2003). Die Bindung von IL-22 an IL-22bp hat eine 4-fach (Wolk *et al.*, 2007) bzw. 20 - 1.000-fach (Jones *et al.*, 2008) höhere Affinität, verglichen mit der Bindung an membrangebundenen IL-22-R1. IL-22bp wird konstitutiv von sekundären Lymphorganen (Milz, Lymphknoten und Thymus), der Brust, der Gebärmutter und von epithelalem Gewebe wie Darm, Lunge und Haut exprimiert (Dumoutier *et al.*, 2001). IL-22bp wird unter Normalbedingen konstitutiv von konventionellen DCs (cDCs) in sekundären Lymphorganen und im Darm produziert (Martin



*et al.*, 2009, Huber *et al.*, 2012). IL-18 kann eine Herabregulation von IL-22bp und somit eine Erhöhung der IL-22 zu IL-22bp Ratio nach einer Gewebeverletzung im Darm bewirken (Huber *et al.*, 2012).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signaltransduktion nach Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor** (modifiziert nach Pan *et al.*, 2013).

## 1.2 Effekte von IL-22

### 1.2.1 Physiologische Effekte von IL-22

IL-22 nimmt eine wichtige Rolle in Wirtsabwehr, Gewebeschutz, Regeneration und Wundheilung ein (siehe Abbildung 2).

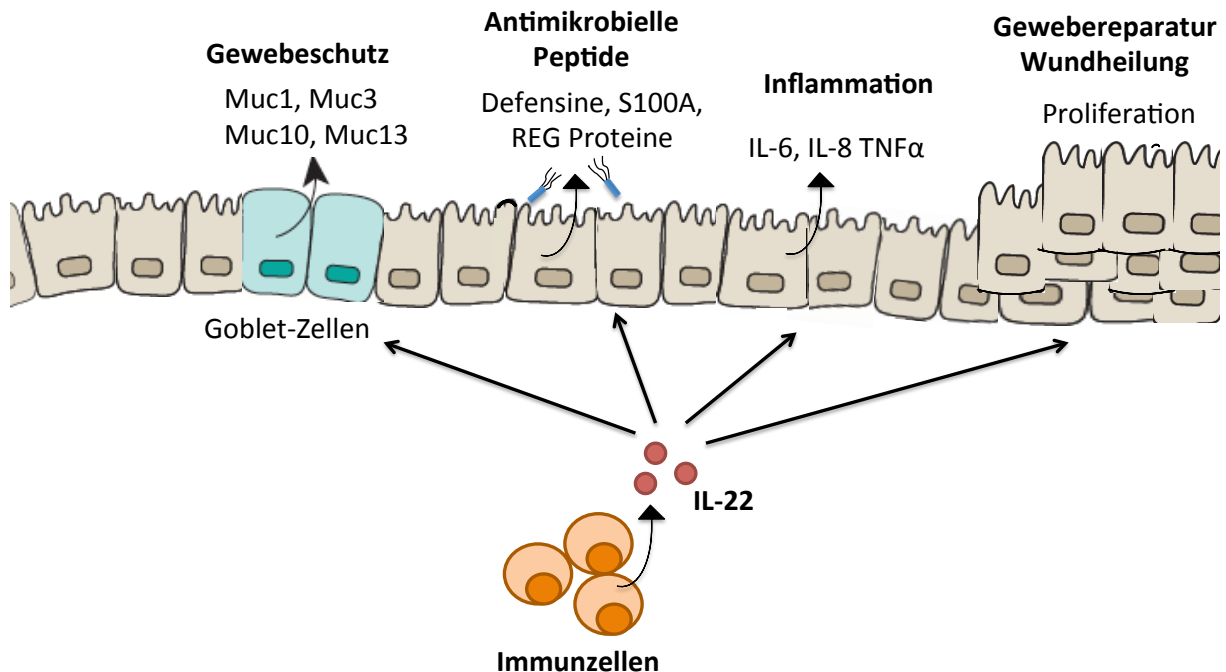
Die Funktion von IL-22 während der Wirtsabwehr gegen extrazelluläre Pathogene kann in drei Kategorien eingeteilt werden. Erstens über den STAT3 vermittelten Proliferationseffekt, welcher die Erhaltung und Erneuerung der Integrität der epithelialen Barriere aufrecht erhält (Rutz *et al.*, 2013). Zweitens induziert IL-22 neben IL-17 und TNF $\alpha$  die Expression antimikrobieller Proteine, welche in der Wirtsabwehr der Haut ( $\beta$ -defensin-2,  $\beta$ -defensin-3), der Luftwege und des Darms (RegIII $\beta$ , RegIII $\gamma$ , Muc1, Muc3, Muc10 und Muc13) involviert sind (Wolk *et al.*, 2004, Liang *et al.*, 2006, Wolk *et al.*, 2006, Aujla *et al.*, 2008, Sugimoto *et al.*, 2008, Zheng *et al.*, 2008). Als drittes fördert IL-22 die Produktion von inflammatorischen Mediatoren, wie IL-6, Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF), IL-1 $\beta$ , serum amyloid A und Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (Wolk *et al.*, 2006, Boniface *et al.*, 2007, Aujla *et al.*, 2008, Liang *et al.*, 2010). Vor allem in der Lunge nimmt IL-22 eine schützende

Funktion ein, indem es die Ausschüttung von Chemokinen wie CXCL1, CXCL5, CXCL9, CCL3 und IL-6 aus Lungenepithelzellen, während einer Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* fördert (Aujla *et al.*, 2008). Zusammenfassend ist die Funktion von IL-22 wichtig, um die bakterielle Replikation und Ausbreitung zu minimieren (Rutz *et al.*, 2013, Sabat *et al.*, 2013). Die schützende Funktion von IL-22 konnten in verschiedenen Infektionen der Lunge, des Darms und der Leber durch beispielsweise *Klebsiella pneumonia* (Aujla *et al.*, 2008), *Citrobacter rodentium* (Zheng *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis* (Simonian *et al.*, 2010), *Mykobakterium tuberculosis* (Dhiman *et al.*, 2009) und *Salmonella enterica* (Schulz *et al.*, 2008) nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu seiner anti-mikrobiellen und pro-inflammatorischen Funktion fördert IL-22 die Geweberegeneration und die Wundheilung, indem es die epitheliale Zellproliferation in verschiedenen Organen, wie Darm, Luftwege, Leber und Thymus verstärkt (Brand *et al.*, 2006, Zenewicz *et al.*, 2007, Simonian *et al.*, 2010, Dudakov *et al.*, 2012). IL-22 induziert die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-xL und *myeloid cell leukemia sequence 1*, sowie von c-Myc, Cyclin D1, *retinoblastoma-like* Protein 2 und *cyclin-dependent* kinase 4, welche im Zellzyklus involviert sind und das Überleben der Zellen weiter fördern (Radaeva *et al.*, 2004, Zenewicz *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2011).

IL-22 nimmt eine schützende Funktion in verschiedenen Lebererkrankungsmodellen ein, indem es die Proliferation von Hepatozyten und die Leberregeneration fördert. IL-22 induzierte die Expression von anti-apoptotischen Genen in Hepatozyten und schützte diese vor einem entzündungsbedingtem Zelltod (Radaeva *et al.*, 2004, Zenewicz *et al.*, 2007). Im Thymus wurde IL-22 abhängig von IL-23 von LT $\alpha$  Zellen sezerniert und war für die Geweberegeneration verantwortlich. IL-22 erhöhte die Proliferation und das Überleben der Epithelzellen im Thymus, welche für die T-Zell Entwicklung essentiell waren (Dudakov *et al.*, 2012). IL-22 konnte die IFN- $\gamma$  abhängige Lungenentzündung in Patienten mit Asthma kontrollieren und nimmt somit eine anti-inflammatorische und regulatorische Rolle ein (Pennino *et al.*, 2013). In allergischen Atemwegserkrankungen konnte IL-22 von ILCs sezerniert werden und die Entzündung sowie die Gewebeschädigung verringern (Taubе *et al.*, 2011). In einem Modell mit intratrachealer Bleomycin-Administration konnte der akute Gewebeschaden und die Entzündung der Luftwege nach Injektion eines anti-IL-22 Antikörpers stark reduziert werden. Dieser Effekt konnte nur in Abwesenheit von IL-17A nachgewiesen werden (Sonnenberg *et al.*, 2010). Akute Pankreatitis (AP) konnte durch die Aktivierung des AhR oder über Zugabe von IL-22 reduziert werden (Xue *et al.*, 2012). Weiterhin spielt IL-22 eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Gewebekomöostase, indem es konstitutiv von ILCs im Dünndarm sezerniert wurde und so die Erhaltung kommensaler

Bakterien förderte (Sonnenberg *et al.*, 2012). Weitere protektive Eigenschaften von IL-22 konnten in inflammatorisch getriebenen Erkrankungen, darunter „*inflammatory bowel disease*“ (IBD), „*graft-versus-host disease*“ (GVHD) assoziiert mit Herz Transplantaten, autoimmuner Myokarditis und Uveitis nachgewiesen werden (Rutz *et al.*, 2013).



**Abbildung 2: Schematische Übersicht der Funktionen von IL-22 auf Epithelzellen** (nach Rutz *et al.*, 2013).

### 1.2.2 Pathophysiologische Rolle von IL-22 während Infektionen und Inflammation

Obwohl IL-22 in die Gewebemöostase, dessen Reparatur und Wundheilung involviert ist, ist eine unkontrollierte, starke Produktion von IL-22 mit einigen Chronisch Entzündlichen- und Autoimmunerkrankungen assoziiert (Rutz *et al.*, 2013). Da IL-22 von T-Zellen ausgeschüttet wird ist es naheliegend, dass es in die Pathogenese von T-Zell-assoziierten Krankheiten wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis oder atopischer Dermatitis involviert ist.

In einem Hepatitis B Virus transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-22 die chronische Leberentzündung verstärkte. Dies zeigt, dass IL-22 pro- und anti-inflammatorisch wirken kann (Zhao *et al.*, 2014).

In atopischer Dermatitis korrelierte IL-22 mit dem Schweregrad der Krankheit (Nogales *et al.*, 2009). Des Weiteren spielte IL-22 eine kritische Rolle in der Pathogenese von Psoriasis. Der Fortschritt der Krankheit war IL-23 abhängig und eine Neutralisation von IL-22 konnte

diesen verhindern (Ma *et al.*, 2008). In einem Imiquimod induzierten Psoriasis Modell waren IL-22 defiziente Mäuse vor Psoriasis Läsionen geschützt (Van Belle *et al.*, 2012).

In einem Teil von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnten hohe IL-22-Level im Serum festgestellt werden (Leipe *et al.*, 2011, da Rocha *et al.*, 2012). Fibroblasten aus Patienten mit Rheumatoider Arthritis und hoher IL-22-Expression zeigten eine höhere Proliferation, sowie eine Sekretion von CCL2, welche Monozyten anlocken konnten (Ikeuchi *et al.*, 2005). Die krankheitsfördernde Rolle von IL-22 in Rheumatoider Arthritis konnte weiterhin in Wild Typ (WT) Mäusen beobachtet werden, welche eine schwerere Arthritis im Vergleich zu IL-22-defizienten Mäuse zeigten (Geboes *et al.*, 2009).

In der entzündeten Mukosa von IBD Patienten konnte eine erhöhte IL-22-Expression festgestellt werden, welche zu einer Hochregulation von pro-inflammatorischen Zytokinen führte (Andoh *et al.*, 2005). Weiterhin wurde eine hohe IL-22-Sekretion in entzündeten Kolonläsionen (Brand *et al.*, 2006) und erhöhte systemische IL-22-Level in Patienten mit Morbus Crohn festgestellt werden (Wolk *et al.*, 2007). In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass IL-22 in Abhängigkeit des AhR von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wurde und die Entzündung im gastrointestinalen Trakt reduziert werden konnte (Zenewicz *et al.*, 2008, Monteleone *et al.*, 2011). Diese pleiotrope Rolle von IL-22 wird dahingehend noch erweitert, dass sowohl inhibitorische, als auch proliferative Effekte auf die Tumorentwicklung gezeigt werden konnten (Witte *et al.*, 2010).

### **1.3 Rolle von IL-22 in Tumorerkrankungen**

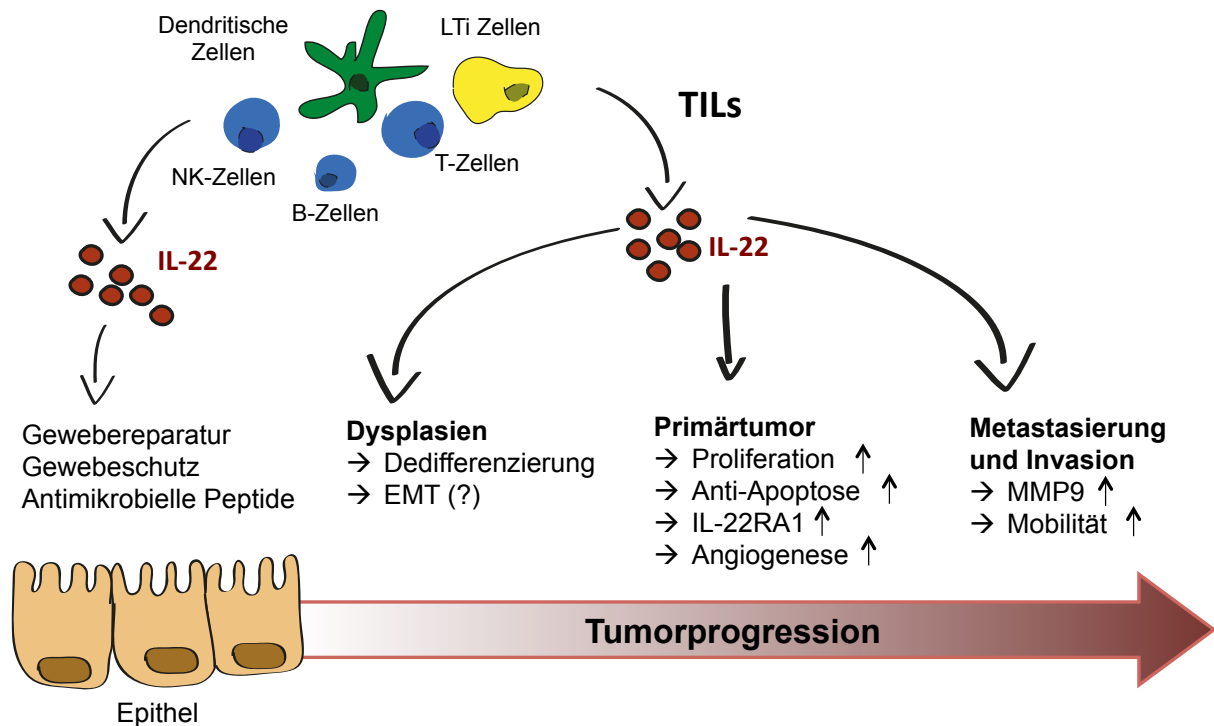
#### **1.3.1 Effekt von IL-22 auf die Tumorentstehung und Progression**

Es scheint, dass IL-22 die Entwicklung von vorhandenen oder induzierten Tumoren beschleunigt und nicht die Mutagenese oder Onkogenese fördert. Eine Überproduktion von IL-22 im Fettgewebe führte in Mäusen mit normalem Futter zu keiner spontanen Tumorentwicklung, während Mäuse mit fettreichem Futter nach einigen Monaten Liposarkome entwickelten (Wang *et al.*, 2011). In einem weiteren transgenen Mausmodell mit konstanter IL-22-Überexpression in der Leber konnte keine erhöhte Inzidenz von spontanen Tumoren festgestellt werden. Allerdings wurde in einem Karzinogen-induzierten Modell eine erhöhte Inzidenz in IL-22 überexprimierenden Mäusen beobachtet (Park *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde eine geringere Anzahl induzierter Lebertumore in IL-22-defizienten Mäusen beobachtet (Jiang *et al.*, 2011).

Nachdem der Tumor entstanden ist nimmt IL-22 eine pro-tumorale Rolle ein. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die IL-22-Expression in Tumorzellen zu erhöhter Proliferation (Gelebart *et al.*, 2011) führt. IL-22-R1 positive Tumorzellen des respiratorischen und intestinalen Trakts, der Leber und des Pankreas reagieren auf IL-22 mit verstärkter Proliferation. Die IL-22-Stimulation reguliert die Expression von verschiedenen Genen abwärts von STAT3, welches als Onkogen bekannt und mit der Entwicklung und Progression vieler epithelialer Tumore assoziiert ist. Des Weiteren verstärkt IL-22 anti-apoptotische Effekte und chemoresistente Tumorzellen regulieren den IL-22-R1 hoch (Kobold *et al.*, 2013). In einer weiteren Studie konnte die IL-22-Expression von Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Kolonkarzinom zu einer gesteigerten Metastasierung führen (Jiang *et al.*, 2013a). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass IL-22 die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) hoch regulieren kann, was zu einer gesteigerten Invasivität der Tumorzellen führte (Ye *et al.*, 2012, Wen *et al.*, 2014). Pankreaskarzinomzellen regulieren den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch IL-22-Stimulation hoch und IL-22 von TILs des Kolorektalen Karzinoms erhöhen die VEGF Expression in einem murinen xeno-transplantiertem Modell (Zhang *et al.*, 2008, Jiang *et al.*, 2013a). Des Weiteren konnte IL-22 oder IL-22-produzierende Th22 Zellen im Magen-, Hepatozellulärem-, Kolon- sowie im Klein- und Großzelligen-Lungenkarzinom identifiziert werden (Jiang *et al.*, 2011, Zhuang *et al.*, 2012, Jiang *et al.*, 2013a, Kobold *et al.*, 2013).

Dennoch argumentieren einige Studien gegen die pro-karzinogene Rolle von IL-22. Im Nierenzellkarzinom konnte IL-22 das Tumorstadium *in vitro* und in einem murinen xeno-transplantiertem Modell durch eine dosisabhängige Erhöhung von phosphoryliertem STAT1 verlangsamen (Zhang *et al.*, 2011). Des Weiteren inhibiert IL-22 das Wachstum von murinen Brustkrebszellen indem es den Zell-Zyklus stoppt (Weber *et al.*, 2006) und verlängert das Überleben in einem murinen Kolonkarzinom Modell (Nagakawa *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann die Rolle von IL-22 in der Tumorentwicklung als pro-tumoral beschrieben werden. In der Literatur sind nur wenige Ausnahmen vorhanden in denen IL-22 einen Tumor hemmenden Effekt einnimmt, welcher ausschließlich in Zelllinien beschrieben wurde. Die Funktionen und Effekte von IL-22 im Rahmen von Tumorprogression sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rolle von IL-22 in verschiedenen Stadien der Tumorprogression** (modifiziert nach Lim and Savan 2014).

### 1.3.2 IL-22-produzierende Lymphozyten in Tumor und Blut von Patienten

Für mehrere Tumorarten konnten erhöhte Frequenzen an IL-22-produzierenden Immunzellen im Tumor und Blut von Patienten ermittelt werden. Erhöhte Mengen an  $CD4^+IL-22^+$  T-Zellen wurden in Magentumoren im Vergleich zum peritumoralem Gewebe, den drainierenden Lymphknoten und dem Normalgewebe identifiziert. Die Infiltration in späteren Tumorstadien war erhöht und diente als negativer prognostischer Marker (Zhuang *et al.*, 2012). Weiterhin konnten erhöhte Mengen an zirkulierenden IL-17 und IL-22-produzierende T-Zellen, im Vergleich zu gesunden Kontrollen im Blut festgestellt werden (Liu *et al.*, 2012). In Patienten mit Kolorektalem Karzinom korrelierte die IL-17 und IL-22 Menge positiv mit dem *Staging* der Tumore (Petanidis *et al.*, 2013). In einem bakteriell induzierten Kolonkarzinom in B- und T-Zell defizienten Mäusen konnten  $IL-22^+$  ILCs intratumoral in dysplastischen Regionen nachgewiesen werden. Ihre Depletion blockierte die Entwicklung des invasiven Kolonkarzinoms in diesem Modell. Des Weiteren führt eine Neutralisation von IL-22 zu einer Reduktion des Kolorektalen Karzinoms, indem es die Proliferation, über die Phosphorylierung von STAT3 induziert (Kirchberger *et al.*, 2013). Die Expression von IL-22 im Pankreaskarzinom im Vergleich zum peritumoralem- und Normalgewebe war erhöht. Zudem konnten mehr  $CD4^+IL-22^+$  T-Zellen und Th22 Zellen im Blut von Patienten und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2014).

Humane tumorinfiltrierende Immunzellen des Hepatozellulären Karzinoms, zeigten im Vergleich zu peripheren Lymphozyten eine erhöhte IL-22-Expression (Jiang *et al.*, 2011). Weiterhin konnten hohe Level an IL-22 im Serum nachgewiesen werden, welche mit einer schlechten Prognose korrelierten (Waidmann *et al.*, 2013). In malignen Pleuraergüssen konnte eine höhere Anzahl an IL-22-produzierenden Th22 Zellen identifiziert werden (Ye *et al.*, 2012). Im Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom (NSCLC) konnten NCR<sup>+</sup> ILC3 identifiziert werden, welche in signifikant höherer Anzahl in Stadium I/II als in weiter fortgeschrittenen Stadien vorhanden waren (Hernandez *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Die Expression des IL-22-Rezeptors im Tumor

In Lymphomen wurde eine hohe IL-22-R1-Expression identifiziert, darunter im Mantelzelllymphom, primären Lymphomen des zentralen Nervensystems und in einer speziellen Subklasse des Non-Hodgkin-Lymphoms (Bard *et al.*, 2008, Gelebart *et al.*, 2011, Sung *et al.*, 2011). Im dukalen Adenokarzinom des Pankreas konnte eine Erhöhung der IL-22 und IL-22-R1 Expression festgestellt werden, welche mit einer schlechten Prognose assoziiert war (Wen *et al.*, 2014). Primäre Zellen und Metastasen des oralen Plattenepithelkarzinoms zeigten eine verstärkte Färbung für den IL-22-R1 (Naher *et al.*, 2012). Chromosomale *gains* am IL-22-R1 Locus wurden in Magenkarzinomzellen festgestellt, was darauf hindeuten könnte, dass diese sehr sensitiv auf IL-22 reagieren (Vauhkonen *et al.*, 2006). Chemo-resistente Lungentumorzellen exprimieren höhere IL-22-R1 Level und proliferieren stärker über STAT3 vermittelte Phosphorylierung, als nicht resistente Tumore (Kobold *et al.*, 2013). In Tabelle 2 ist eine Übersicht der IL-22 und IL-22-R1 exprimierenden Tumorentitäten dargestellt.

**Tabelle 2: Übersicht von Tumorerkrankungen welche mit IL-22 assoziiert sind**

| Karzinom                   | Effekt von IL-22 auf den Tumor | Referenz                           |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Tumorerkrankungen der Haut | Pro-tumoral                    | (Nardinocchi <i>et al.</i> , 2015) |
| Kolonkarzinom              | Pro-tumoral                    | (Jiang <i>et al.</i> , 2013a)      |
|                            | Pro-tumoral                    | (Thompson <i>et al.</i> , 2010)    |
|                            | Pro-tumoral                    | (Ziesche <i>et al.</i> , 2007)     |
|                            | Anti-tumoral                   | (Nagakawa <i>et al.</i> , 2004)    |
|                            | Pro-tumoral                    | (Kryczek <i>et al.</i> , 2014)     |

|  |  |                                    |
|--|--|------------------------------------|
| Kolorektales<br>Karzinom                       | Erhöhte IL-22-Expression   | (Petanidis <i>et al.</i> , 2013)   |
|  | Pro-tumoral  | (Kirchberger <i>et al.</i> , 2013) |
|  | Pro-tumoral  | (Huber <i>et al.</i> , 2012)       |
|  | Pro-tumoral  | (Huang <i>et al.</i> , 2015)       |
| Klein- und<br>Großzelliges-Lungen-<br>karzinom | Pro-tumoral  | (Kobold <i>et al.</i> , 2013)      |
| Nicht-Kleinzelliges<br>Lungenkarzinom          | NCR <sup>+</sup> ILC3 sind in signifikant höherer<br>Anzahl in Stadium I/II als in weiter<br>fortgeschrittenen Stadien vorhanden | (Carrega <i>et al.</i> , 2015)     |
|  | Pro-tumoral  | (Zhang <i>et al.</i> , 2008)       |
| Lymphom  | Pro-tumoral  | (Ito <i>et al.</i> , 2014)         |
|  | Pro-tumoral  | (Miyagaki <i>et al.</i> , 2011)    |
|  | Pro-tumoral  | (Gelebart <i>et al.</i> , 2011)    |
|  | Pro-tumoral  | (Bard <i>et al.</i> , 2008)        |
|  | Pro-tumoral  | (Sung <i>et al.</i> , 2011)        |
| Hepatozelluläres<br>Karzinom                   | Pro-tumoral  | (Jiang <i>et al.</i> , 2013b)      |
|  | Pro-tumoral  | (Waidmann <i>et al.</i> , 2013)    |
|  | Pro-tumoral  | (Jiang <i>et al.</i> , 2011)       |
|  | Pro-tumoral  | (Qin <i>et al.</i> , 2014)         |
| Magenkarzinom                                  | Pro-tumoral  | (Zhuang <i>et al.</i> , 2012)      |
|  | Pro-tumoral  | (Liu <i>et al.</i> , 2012)         |
|  | Pro-tumoral  | (Fukui <i>et al.</i> , 2014)       |
| Mammakarzinom                                  | Pro-tumoral  | (Kim <i>et al.</i> , 2014)         |
|  | Anti-tumoral   | (Weber <i>et al.</i> , 2006)       |
| Nierenkarzinom                                 | Anti-tumoral   | (Zhang <i>et al.</i> , 2011)       |
| Pankreaskarzinom                               | Pro-tumoral  | (Xu <i>et al.</i> , 2014)          |
|  | Pro-tumoral  | (Wen <i>et al.</i> , 2014)         |
|  | Pro-tumoral  | (Curd <i>et al.</i> , 2012)        |
| Zervixkarzinom                                 | Pro-tumoral  | (Zhang <i>et al.</i> , 2015)       |



## 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

IL-22 konnte in den meisten Tumorgeweben identifiziert werden, darunter auch in Brust- und Lungentumoren (Kobold *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2014). IL-22 wurde als zentraler Tumor-fördernder Faktor im Kolonkarzinom beschrieben (Huber *et al.*, 2012, Kirchberger *et al.*, 2013, Kryczek *et al.*, 2014) und konnte von tumorinfiltrierten Immunzellen in verschiedenen Tumorentitäten sezerniert werden (Lim and Savan 2014). Der Mechanismus welcher zu einer IL-22-Produktion in der Tumorumgebung führt, ist bis heute in keiner Tumorart identifiziert worden.

In dieser Arbeit sollte daher die Quelle und der Mechanismus der IL-22-Expression in Lungen- und Brustkarzinomen analysiert werden.

- Identifikation IL-22-produzierender Zellen im Line-1- (Lungentumorzelllinie) und 4T1- (Brusttumorzelllinie) Tumormodell *in vivo*
- Identifikation IL-22 sezernierender Immunzellpopulationen nach Stimulation mit Line-1- oder 4T1-Tumorzellüberstand *in vitro*
- Analyse der IL-22-produzierenden Immunzellpopulationen nach Stimulation mit humanem Lungen- (A549, HCC827 und H1339) und Brusttumorzellüberstand (MCF7, CAMA1 und MDAMB231) *in vitro*
- Untersuchung des Einflusses der Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t auf die IL-22-Sekretion in der Tumorumgebung *in vitro* und *in vivo*
- Analyse primärer Lungentumore aus Patienten auf infiltrierende IL-22-produzierende Immunzellen

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Albumin Fraktion V (BSA)                      | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10x)             | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Biocoll Separating Solution (d = 1,077 g/ml)  | Biochrom Merck Millipore, Darmstadt |
| Brefeldin A                                   | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                       | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| Dithiothreitol (DTT)                          | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| Easycoll Separating Solution (d = 1,124 g/ml) | Biochrom Merck Millipore, Darmstadt |
| Ethanol 96-100 % (rein)                       | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| FACSFlow                                      | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Heparin-Natrium (25.000 I.E.)                 | Ratiopharm, Ulm                     |
| Isofluran                                     | CP Pharma, Burgdorf                 |
| Isopropanol p.A.                              | Applichem, Darmstadt                |
| Schwefelsäure (2 M)                           | Apotheke des Klinikums LMU          |
| Trypanblau                                    | Sigma-Aldrich, Steinheim            |
| Trypsin                                       | PAA, Pasching, Österreich           |
| Tween-20                                      | Roth, Karlsruhe                     |

### 2.2 Gebrauchs und Verbrauchsmaterialien

|   |   |
|---|---|
| 96-Well-Platten (qRT-PCR)                             | Roche, Mannheim                           |
| 96-Well-Platten (ELISA)                               | Costar Corning, New York, USA             |
| 96-Well-Platten (Zellkultur)                          | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FACS-Röhrchen   | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Kryoröhrchen  | greiner bio-one, Frickenhausen            |
| Nylon- Filter (100 µm, 30 µm)                         | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach       |
| Perfusionsspritzen-Luer-Lok <sup>TM</sup> Tip (50 ml) | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Petrischalen  | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Pipetboy  | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt         |
| Pipetten  | Eppendorf, Hamburg                        |
| Polypropylene round bottom tube                       | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Serologische Pipetten                                 | Costar Corning, New York, USA             |
| Spritzen (2 ml, 10 ml)                                | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Tubes (0,5; 1,5; 2,0 ml)                              | Sarstedt, Nümbrecht                       |

## 2.3 Geräte

|                        |                  |                                    |
|------------------------|------------------|------------------------------------|
| Autoklav               | Varioklav 500E   | HP Medizintechnik, München         |
| FACS                   | Canto II         | BD Biosciences, San Jose, USA      |
| Heizblock              | 5436             | Eppendorf, Hamburg                 |
| Inkubator (Zellkultur) | BD 6220          | Heraeus Instruments, Hanau         |
| Lightcycler            | 480 II           | Roche, Mannheim                    |
| Mikroskop              | Axiovert 40C     | Zeiss, Jena                        |
|                        | Axiovert HAL 100 | Zeiss, Jena                        |
| Mithras                | LB940            | Berthold, Bad Wildbad              |
| NanoDrop               | 2000c            | Thermo Fischer, Massachusetts, USA |
| Neubauer-Zählkammer    |                  | Brand, Berlin                      |
| pH-Meter               |                  | WTW GmbH, Weilheim                 |
| Sterilbank             | HeraSAFE KS      | Heraeus Instruments, Hanau         |
| Thermocycler           | T3               | Biometra, Göttingen                |
| Thermoschüttler        |                  | Eppendorf, Hamburg                 |
| Vortexer               | RS VA 10         | Phoenix, Garbsen                   |
| Waage                  | CPA 1003S        | Sartorius Laboratory, Göttingen    |
| Wasserbad              | Unitherm HB      | uni equip, München                 |
| Zentrifugen            | 3L-R Multifuge   | Heraeus Instruments, Hanau         |
|                        | Centrifuge 5418R | Eppendorf, Hamburg                 |
|                        | Rotina 420R      | Hettich GmbH, Tuttlingen           |

## 2.4 Puffer und Lösungen

### Lysepuffer Tumore

|             |            |
|-------------|------------|
| RPMI        | 50 ml      |
| Kollagenase | 1 mg/ml    |
| DNase       | 0,05 mg/ml |

### FACS-Puffer

|     |        |
|-----|--------|
| PBS | 500 ml |
| FKS | 10 %   |

## 2.5 Antikörper

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Neutralisations-Antikörper**

| Antikörper               | Klon    | Hersteller  | Konzentration  |
|--------------------------|---------|-------------|----------------|
| Anti-human IL-1 $\alpha$ | 7D4     | InvivoGen   | 10 $\mu$ g/ml  |
| Anti-human IL-1 $\beta$  | 4H5     | InvivoGen   | 10 $\mu$ g/ml  |
| Anti-Maus IL-1 $\alpha$  | ALF-161 | eBioscience | 2,5 $\mu$ g/ml |
| Anti-Maus IL-23          | HNU2319 | eBioscience | 2,5 $\mu$ g/ml |

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper**

| Antikörper                                 | Klon         | Hersteller  | Konzentration     |
|--|--------------|-------------|-------------------|
| Anti-human CD3 $\epsilon$ -APC             | OKT3         | Biolegend   | 2 $\mu$ g/ml*     |
| Anti-human CD4-FITC                        | A161A1       | Biolegend   | 0,5 $\mu$ g/ml*   |
| Anti-human CD8-APC-Cy7                     | HIT8a        | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml*     |
| Anti-human CD11b-APC                       | ICRF44       | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml*     |
| Anti-human IFN $\gamma$ -PE-Cy7            | 4S.B3        | Biolegend   | 0,7 $\mu$ g/ml*   |
| Anti-human IL-17-FITC                      | BL168        | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml*     |
| Anti-human IL-22                           | 22URTI       | eBioscience | 0,06 $\mu$ g/ml   |
| Anti-Maus CD3 $\epsilon$ -APC              | 145-2C11     | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus CD4-PaqBlue                      | GK1.5        | Biolegend   | 2,5 $\mu$ g/ml    |
| Anti-Maus CD8-APC-Cy7                      | 53-6.1       | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus/human CD11b-APC-Cy7              | M1/70        | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus CD11c-APC                        | N418         | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus CD19-PerCPCy5.5                  | 6D5          | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus F4/80-Paqblue                    | BM8          | Biolegend   | 2,5 $\mu$ g/ml    |
| Anti-Maus Gr1-FITC                         | RB6-8C5      | Biolegend   | 2,5 $\mu$ g/ml    |
| Anti-Maus IL-17-FITC                       | TC11-18H10.1 | Biolegend   | 2,5 $\mu$ g/ml    |
| Anti-Maus IL-22-PE                         | 140301       | R&D         | 5 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus Ly6C-PerCPCy5.5                  | HK1.4        | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Anti-Maus Nkp46-Pe-Cy7                     | 29A1.4       | Biolegend   | 1 $\mu$ g/ml      |
| Human TruStain FcX                         | -            | Biolegend   | 1 $\mu$ l/Färbung |
| Mouse IgG1 $\kappa$ -PE Isotyp Kontrolle   | MOPC-21      | Biolegend   | 5 $\mu$ g/ml      |
| Rat IgG <sub>2A</sub> -PE Isotyp Kontrolle | 54447        | R&D         | 1 $\mu$ g/ml      |
| TruStain FcX (anti-mouse CD16/32)          | 93           | Biolegend   | 2,5 $\mu$ g/ml    |

\* bei Patientenproben wurde die Antikörper Konzentration verfünffacht (Herstellerangaben).

## 2.6 Kits und Assays

Bio-Plex Cell Lysis Kit  
 Cytofix/Cytoperm  
 IC Fixation/ Permeabilization Kit  
 IFN $\gamma$  ELISA MAX<sup>TM</sup> (murin)  
 IFN $\gamma$  ELISA (human)  
 InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit  
 IL-1 $\alpha$  ELISA Ready-SET-Go! (murin)  
 IL-1 $\alpha$  ELISA (human)

Bio Rad, München  
 BD Biosciences, Heidelberg  
 eBioscience, Frankfurt  
 BD Biosciences, Heidelberg  
 BD Biosciences, Heidelberg  
 Stratec Molecular GmbH, Berlin  
 Affimetrix/eBioscience, San Diego, USA  
 R & D Systems, Minneapolis, USA

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| IL-1 $\beta$ ELISA (human)       | R & D Systems, Minneapolis, USA             |
| IL-17 ELISA Duo Set (murin)      | R & D Systems, Minneapolis, USA             |
| IL-17A ELISA (human)             | Biolegend, San Diego, USA                   |
| IL-22 ELISA (murin)              | Antigenix America Inc., Huntington Sta., NY |
| IL-22 ELISA (human)              | R & D Systems, Minneapolis, USA             |
| IL-23 ELISA Duo Set (murin)      | R & D Systems, Minneapolis, USA             |
| Magnetic Cell Sorting            | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach     |
| RevertAid Premium First Strand   | Fermentas, Rockford, USA                    |
| Universal Probe Library          | Roche, Mannheim                             |
| Zombie NIR Fixable Viability Kit | Biolegend, San Diego, USA                   |

Alle Kits und Assays wurden nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.7 Enzyme

|  |                              |
|--|------------------------------|
| DNase I  | Roche, Mannheim              |
| Kollagenase  | Sigma-Aldrich, Steinheim     |
| RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/μl) | Thermo Fischer, Waltham, USA |

## 2.8 qRT-PCR Primer

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten qRT-PCR Primer**

| Gen               | Sequenz (5' → 3')         | Sonden |
|-------------------|---------------------------|--------|
| HPRT fwd          | TCC TCC TCA GAC CGC TTT T | 95     |
| HPRT rev          | CCT GGT TCA TCA TCG CTA   | 95     |
| IL-1 $\alpha$ fwd | TTG GTT AAA TGA CCT GCA   | 52     |
| IL-1 $\alpha$ rev | GAG CGC TCA CGA ACA GTT   | 52     |
| IL-23 fwd         | TCC CTA CTA GGA CTC AGC   | 19     |
| IL-23 rev         | AGA ACT CAG GCT GGG CAT   | 19     |

## 2.9 Zelllinien, Zusätze und Medium

### 2.9.1 Zusätze und Grundmedien

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle's medium                       | PAA, Pasching, Österreich |
| Fötales Kälber Serum (FKS)                               | GibcoBRL, Karlsruhe       |
| (vor Gebrauch für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert) |                           |
| L-Glutamin (200 mM)                                      | PAA, Pasching, Österreich |
| Natriumpyruvat   | PAA, Pasching, Österreich |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)                     | PAA, Pasching, Österreich |
| Penicillin/Streptomycin (100x)                           | PAA, Pasching, Österreich |
| Roswell Park Memory Institute (RPMI) 1640                | PAA, Pasching, Österreich |

Trypsin (10x)  
VLE RPMI 1640

PAA, Pasching, Österreich  
Biochrom Merck Millipore, Darmstadt

## 2.9.2 Zellkulturmedium

### DMEM<sup>+++</sup>

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| DMEM Vollmedium | 500 ml    |
| FKS             | 10 %      |
| Penicillin      | 1 IU/ml   |
| Streptomycin    | 100 µg/ml |
| L-Glutamin      | 2 mM      |

### Kryo Medium:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| FKS               | 400 µl |
| DMSO              | 100 µl |
| Medium mit Zellen | 500 µl |

### RPMI<sup>+++</sup>

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| RPMI 1640 Vollmedium | 500 ml    |
| FKS                  | 10 %      |
| Penicillin           | 1 IU/ml   |
| Streptomycin (100x)  | 100 µg/ml |
| L-Glutamin           | 2 mM      |

### PBMC Medium:

|               |           |
|---------------|-----------|
| VLE RPMI 1640 | 500 ml    |
| humanes Serum | 10 %      |
| Penicillin    | 1 IU/ml   |
| Streptomycin  | 100 µg/ml |
| L-Glutamin    | 2 mM      |
| NEAA (100%)   | 1 %       |

## 2.9.3 Zelllinien

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zelllinien**

| Name     | Zelltyp                      | Spezie | Medium              | Referenz                      |
|----------|------------------------------|--------|---------------------|-------------------------------|
| 4T1      | Mammakarzinom                | Murin  | DMEM <sup>+++</sup> | (Miller <i>et al.</i> , 1983) |
| A549     | Lungenkarzinom               | Human  | DMEM <sup>+++</sup> | ATCC: CCL185                  |
| CAMA1    | Mammakarzinom-Metastase      | Human  | DMEM <sup>+++</sup> | ATCC: HTB-21                  |
| HCC827   | Lungen-Adenokarzinom         | Human  | RPMI <sup>+++</sup> | ATCC: CRL-2868                |
| H1339    | Kleinzelliges Lungenkarzinom | Human  | RPMI <sup>+++</sup> | ATCC: CRL-5979                |
| Line-1   | Lungenalveolarkarzinom       | Murin  | RPMI <sup>+++</sup> | (McLean <i>et al.</i> , 2004) |
| MCF7     | Mammakarzinom-Metastase      | Human  | DMEM <sup>+++</sup> | ATCC: HTB-22                  |
| MDAMB231 | Mammakarzinom-Metastase      | Human  | DMEM <sup>+++</sup> | ATCC: HTB-26                  |

Alle humanen Zelllinien wurden über ein STR-Profil identifiziert.

## 2.10 Zytokine und Stimulanzen

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Kineret® (Anakinra) [100 mg/0,67 ml]                         | Swedish Orphan Biovitrum AB, Schweden |
| Ionomycin Kalziumsalz<br>von <i>Streptomyces conglobatus</i> | Sigma-Aldrich, Steinheim              |
| Rekombinates humanes IL-1 $\alpha$                           | Peptotech, Hamburg                    |
| Rekombinates humanes IL-1 $\beta$                            | Peptotech, Hamburg                    |
| Rekombinates murines IL-1 $\alpha$                           | Biolegend, San Diego, USA             |
| Rekombinantes murines IL-23                                  | Biolegend, San Diego, USA             |
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)                        | Sigma-Aldrich, Steinheim              |

## 2.11 Software

|                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Adobe Creative Suite        | Adobe Systems, San Jose, USA     |
| BD FACSDiva                 | BD Biosciences, San Diego, USA   |
| EndNote X6                  | Thomson Reuters, Carlsbad, USA   |
| Flow Jo 8.8.2               | Tree Star, Ashland, USA          |
| GraphPad PRISM® Version 5.0 | GraphPad Software, La Jolla, USA |
| Lasergene                   | DNA star                         |
| LightCycler® 480 SW 1.5     | Roche, Mannheim                  |
| Microsoft Office 2011       | Microsoft, Redmond, WA, USA      |

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Zunächst wurde die RNA aus den Zellen mit Hilfe des InviTrap Spin Cell RNA Mini Kits von Stratec Molecular GmbH, Berlin isoliert, welches gemäß Herstellerangaben verwendet wurde. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Nanodrops bestimmt und anschließend 1 - 2 µg RNA für die Reverse Transkription einzusetzen. Zum Mastermix werden Oligo-dTs zugegeben, welche an die PolyA-Schwänze der mRNA-Moleküle binden können. Der Mastermix, sowie das Thermocycler-Programm sind in nachfolgenden Tabellen dargestellt. Die Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

**Tabelle 7: RT-PCR Reaktionsansatz**

| Reagenzien                           | [µl]     |
|--------------------------------------|----------|
| RNA [1 - 2 µg]                       | x        |
| H <sub>2</sub> O                     | 11,0 - x |
| Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer      | 1,0      |
| RT-Puffer (5x)                       | 4,0      |
| dNTPs                                | 2,0      |
| RNAsin/Ribolock [40 U/µl]            | 1,0      |
| revertAcid H-minus M-MuLV (200 U/µl) | 1,0      |
| Gesamtvolumen                        | 20,0     |

**Tabelle 8: PCR-Cycler Programm für die RT-PCR**

| Phase         | Zeit [min] | Temperatur [°C] |
|---------------|------------|-----------------|
| Transkription | 30         | 50              |
| Termination   | 5          | 85              |
| Abkühlung     | hold       | 4               |

##### 3.1.2 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Die gewonnene cDNA kann mit dieser Methode amplifiziert und gleichzeitig relativ oder absolut quantifiziert werden. Das Reaktionsprodukt wird in Echtzeit in jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal gemessen und die Expression des zu analysierenden Gens auf ein Referenztranskript normalisiert. Der sogenannte "Hydrolysis Probe Assay" von Roche wurde verwendet, da diese Methode über die Verwendung von speziellen Sonden hoch spezifisch ist. Diese Sequenz-spezifischen Sonden aus der „Universal Probe Library“ (UPL) von Roche sind am 5'-Ende mit Fluoreszin (Reporter) und am 3'-Ende an ein „Quencher“-Fluorophor gekoppelt. Nach der Anlagerung der sequenzspezifischen Sonde an den DNA-Strang kann



die Fluoreszenzdetektion des Fluoreszins mittels *fluorescence energy transfer* (FRET) verhindert werden. Die Sonde wird durch die 5' zu 3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zerstört und die Fluoreszenz kann nun detektiert werden (Heid *et al.*, 1996). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer, sowie die sequenzspezifischen Sonden wurden über einen Internet-basierten Algorithmus entworfen (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/ezhome.html>). Es wurde, je nach Gen die in Tabelle 9 dargestellten Komponenten verwendet und anschließend die qRT-PCR im LightCycler 480 II mit unten stehendem Programm (siehe Tabelle 10) durchgeführt.

**Tabelle 9: qRT-PCR Reaktionsansatz**

| Reagenzien       | [µl] |
|------------------|------|
| Mastermix Roche  | 5    |
| H <sub>2</sub> O | 1,5  |
| Primer for       | 0,2  |
| Primer rev       | 0,2  |
| Sonde            | 0,1  |
| Probe            | 3    |
| Gesamtvolumen    | 10   |

**Tabelle 10: qRT-PCR Program für den LightCycler 480 II**

| Programm      | Zyklen | Temperatur [°C] | Inkubationszeit [sek] |
|---------------|--------|-----------------|-----------------------|
| Denaturieren  | 1      | 95              | 600                   |
| Amplifizieren | 40     | 95              | 15                    |
| Kühlen        | 1      | 40              | 60                    |

Zur Quantifizierung der cDNA wird der sogenannte „Crossing Point“ (CP) herangezogen. Dieser Punkt ist erreicht, wenn nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht ist. An diesem Punkt ist die Menge der neu synthetisierten DNA in jedem Well identisch. Zur Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) wurde die sogenannte  $\Delta\Delta\text{CP}$  Methode verwendet. Die Berechnung erfolgte wie im Folgenden dargestellt (Pfaffl, 2004; Heid *et al.*, 1996):

$$\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP} - \Delta\text{CP}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Zur Auswertung wurde das Programm LightCycler® 480 SW 1.5 verwendet.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Sämtliche Zellkulturarbeiten der verwendeten Zelllinien wurden unter einer Sterilbank mit Umluft durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Ablösen der adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte durch ca. fünfminütige Inkubation bei 37°C in einer Trypsin/EDTA-Lösung. Um die Zellzahl in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst vereinzelt und in einem 1:10-Verhältnis mit Trypanblau verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Blau angefärbte Zellen wurden nicht mitgezählt, da diese den Farbstoff infolge einer defekten Membran aufgenommen hatten und daher als tot gewertet werden konnten. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{absolute Zellzahl} = \left( \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \right) * V_T * V_M * 10^4$$

V<sub>T</sub>: Verdünnung mit Trypanblau

V<sub>M</sub>: Volumen an Medium

### 3.2.2 Isolation von Splenozyten

Die Milz wurde entnommen und in RPMI<sup>+++</sup> gegeben. Anschließend wurde sie mit Hilfe eines sterilen Stempels einer 10 ml Spritze durch einen 100 µm Filter gedrückt und dieser mit 10 ml RPMI<sup>+++</sup> durchgespült. Nach nochmaligem Filtern durch einen 30 µm Filter wurde die Suspension bei 400 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und das Pellet in 2 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Nach 90 Sekunden Inkubation wurde die Lyse über die Zugabe von 10 ml RPMI<sup>+++</sup> abgestoppt und die Zellen abermals abzentrifugiert. Nachdem das Pellet nochmals gewaschen wurde, konnten die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt und in Kultur genommen werden.

### 3.2.3 Isolation von Tumor- und Lungenzellen

Der subkutan injizierte Tumor, die Lunge, sowie die Leber wurden entnommen, mit einem Skalpell zerkleinert und für 30 Minuten bei 37°C in ein DNase/Kollagenase Enzymgemisch auf einem Thermoschüttler inkubiert. Im Folgenden wurden Einzelzellsuspensionen der Organe wie in 3.2.2 beschrieben hergestellt. Die Tumore wurden statt in Medium in PBS

aufgenommen und weiterhin über einen Dichtegradienten mittels Easycoll ( $d = 1,124 \text{ g/ml}$ ) aufgereinigt.

#### 3.2.4 Isolation von PBMCs

Um mononukleare Zellen des peripheren Bluts zu isolieren wurde ein Dichtegradient mittels Biocoll ( $d = 1,077 \text{ g/ml}$ ) genutzt. Zunächst wurden 30 - 50 ml Blut von einem Spender abgenommen und jeweils 10 ml des Blutes mit 10 ml PBS gemischt. Anschließend wurde dieses Gemisch vorsichtig auf 10 ml Biocoll geschichtet und für 20 Minuten bei 1.000 g auf RT ohne Bremse zentrifugiert. Nun wurde der PBMC-Ring vorsichtig abgenommen und das Falcon mit PBS auf 50 ml aufgefüllt (10 Minuten, 500 g, RT). Die PBMCs eines Spenders wurden nun in ein Falcon vereint und nochmal mit 50 ml PBS gewaschen (10 Minuten, 400 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

#### 3.2.5 Isolation von Lymphozyten aus Mamma- und Bronchialkarzinomen

Das Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell homogenisiert, in ein Kollagenase/DNase Gemisch gegeben und für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch einen  $100 \mu\text{m}$  und anschließend einen  $30 \mu\text{m}$  Filter gegeben und die Filter mit 10 ml DMEM<sup>+++</sup> gespült. Erythrozyten wurden mittels eines Lysepuffers entfernt. Anschließend wurde die Färbung der Zytokine und die FACS Analyse (wie in 3.3 beschrieben) durchgeführt.

#### 3.2.6 Zellstimulation

Es wurde eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in verschiedenen großen Wells entsprechend ihres möglichen Volumens ausgesät und die jeweilige Konzentration an Zytokinen zugegeben. Der Überstand wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen, zentrifugiert, sowie wiederum abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei Stimulation mit Überstand aus Tumorzelllinien wurde die Hälfte des Mediums durch den zellfreien Tumorüberstand ersetzt.

### **3.3 Durchflusszytometrie**

Über die Durchflusszytometrie können Zellen auf Grund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität quantifiziert werden. Die Durchflusszytometrie erfolgte an einem FACS Canto II Durchflusszytometer und die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Flow Jo 8.8.2 von Tree Star, Ashland, USA.

Zunächst wurden die Zellen je nach Organ wie in 3.2.3 beschrieben isoliert. Für jede Färbung wurden  $10^6$  -  $10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS in eine 96-U-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden 0,5  $\mu$ l Fc-Block zugeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper abzusättigen. Als nächstes erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit den direkt-gekoppelten Antikörpern im Dunkeln bei 4°C. Im Folgenden wurden die Zellen für 5 Minuten, bei 400 x g, 4°C abzentrifugiert und mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Dies wurde noch zwei Mal wiederholt und die Zellen im letzten Schritt in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und eingelesen. Bei intrazellulären Färbungen wurden 100  $\mu$ l Fixationspuffer zugegeben, welcher für 20 Minuten bei RT (oder Ü/N bei 4°C) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Permeabilisationspuffer zugegeben und die Zellen bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals mit 200  $\mu$ l Permeabilisationspuffer wiederholt. Für die Färbung wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Permeabilisationspuffer aufgenommen, zunächst der Fc-block zugegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die direkt-gekoppelte Antikörper zugegeben, welcher für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen für 5 Minuten, bei 400 g, 4°C abzentrifugiert und zwei Mal mit 200  $\mu$ l Permeabilisationspuffer gewaschen. Diese Prozedur wurde noch ein Mal mit FACS-Puffer wiederholt und die Zellen im letzten Schritt in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen, sowie in FACS-Röhrchen überführt und eingelesen. Als Negativkontrolle wurde im Fall der intrazellulären Färbung immer eine Färbung mit der jeweiligen Isotypkontrolle des Antikörpers vorgenommen und eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm Flow Jo 8.8.2 verwendet.

### **3.4 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.4.1 Tierhaltung**

Für Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes Balb/c herangezogen. Die WT Tiere wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen von der Firma Janvier (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen und frühestens eine Woche nach Anlieferung

für Versuche eingesetzt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik Innenstadt. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2.1.54-2532-90/12).

### 3.4.2 Subkutanes Tumormodell

Den Mäusen wurden  $1,25 \times 10^5$  4T1 bzw.  $5 \times 10^5$  Line-1 Tumorzellen (siehe 2.9.3) in 100  $\mu$ l PBS subkutan in die rechte Flanke injiziert. Zur Injektion wurden zu 80 % konfluent wachsende Tumorzellen verwendet. Nach Tumorzellinjektion wurde die Tumorgroße in  $\text{mm}^2$  (Länge des Tumors in mm x Breite des Tumors in mm) mit Hilfe einer elektronischen Schiebelehre vermessen. Die Tiere wurden täglich nach Tumorinduktion beobachtet, wobei sowohl Tumorgroße, Gewicht als auch Allgemeinbefinden beurteilt und dokumentiert wurden. Es wurden neben Tumorgroße, Morphologie und Fläche auch das Gewicht, das Verhalten, die Atmung und der *body condition score* beurteilt. Zum sofortigen Abbruch des Versuches durch zervikale Dislokation unter Isoflurananästhesie kam es wenn die Tumoorfläche 225  $\text{mm}^2$  oder der größte Durchmesser 1,5 cm überstieg, mehr als 15 % des Ausgangsgewicht verloren wurde, das provozierte Verhalten erheblich gedämpft war, die Atmung deutlich beschleunigt bzw. erschwert war, eine permanente Buckelhaltung bestand, ein exulzierter Tumor vorhanden war, ein *body condition score* von 1 bestand oder die Summe der Belastungspunkte 4 erreichte. Für nicht normale Verhaltensmuster wurden Punkte vergeben, wobei jede Auffälligkeit mit einem Punkt bewertet wurde. Je mit einem Punkt bewertet wurden folgende Muster: Motorische Aktivität gedämpft aber normales Muster provozierten Verhaltens; Atmung gering beschleunigt; intermittierende Buckelhaltung; Gewichtsabnahme von bis zu 10%, *body condition score* von 2 bis 4 und Tumor deutlich sichtbar aber intakte Haut. Im Falle der metastasierenden Tumormodelle wurde die Belastung insbesondere über den *body condition score* erfasst, da die Metastasierung nicht direkt messbar ist und zu einer Kachexie führen kann ohne absolute Gewichtsabnahme (aufgrund der zunehmenden Tumormassen).

### 3.4.3 Organentnahme

Mäuse des benötigten Mausstammes wurden mittels Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die jeweiligen Organe wurden unter möglichst sterilen Bedingungen entnommen und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.5 Patientenkollektiv mit Bronchialkarzinom

Das Gewebe von 15 Patienten mit Bronchialkarzinom wurde von der Biobank unter der Führung der *human tissue and cell research* (HTCR) Stiftung am Klinikum der Universität München bereitgestellt. Die Gewebeproben und die Daten wurden anonymisiert aus der Datenbank nach Genehmigung des zuständigen Personals zur Verfügung gestellt. Jeder Patient wurde schriftlich über die Studie aufgeklärt und die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät am Klinikum der Universität München und der Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 025-12). Die Biobank ist nach ISO 9001:2008 zertifiziert (Thasler *et al.*, 2003). Geschlecht, Alter, Histologie, Vorbehandlung und UICC Status der Patienten sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Ein kleines Stück des Präparats wurde mittels flüssigem Stickstoff eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt Proteinlysate analysieren zu können. Aus dem primären Tumorgewebe wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt (siehe 3.2.5), welche mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.3) analysiert wurde, um IL-22-exprimierende Immunzellen zu identifizieren.

**Tabelle 11: Übersicht des Patientenkollektivs**

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Gesamt</b>          | <b>15</b> |
| <b>UICC</b>            |           |
| 0                      | 0         |
| IA                     | 3         |
| IB                     | 2         |
| IIA                    | 1         |
| IIB                    | 3         |
| IIIA                   | 5         |
| IIIB                   | 1         |
| IV                     | 0         |
| <b>Histologie</b>      |           |
| Adenokarzinom          | 12        |
| Plattenepithelkarzinom | 1         |
| Atypisches Karzinoid   | 2         |
| <b>Vorbehandlung</b>   |           |
| Chemotherapie          | 3         |
| Radio-Chemotherapie    | 1         |
| <b>Alter</b>           |           |
| 50-59                  | 2         |
| 60-69                  | 6         |
| 70-79                  | 6         |
| 80-89                  | 1         |
| <b>Geschlecht</b>      |           |
| Weiblich               | 11        |
| Männlich               | 4         |

### 3.6 Statistische Auswertungsverfahren

In dieser Arbeit wurden bei multiplen Experimenten die Werte als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung als Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt ist. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test für ungepaarte Stichproben oder mit dem Mann-Whitney U Test, falls Daten von individuellen Mäusen verglichen wurden. Der zweiseitigen Student's t-Test für gepaarte Stichproben wurde verwendet wenn individuelle humane Donoren untereinander verglichen wurden. Statistische Signifikanz wurde angenommen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$  und so in den Abbildungen gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism. Die mathematische Analyse und die graphische Darstellung erfolgten mit GraphPad Prism, Microsoft Office Excel und Adobe Illustrator.

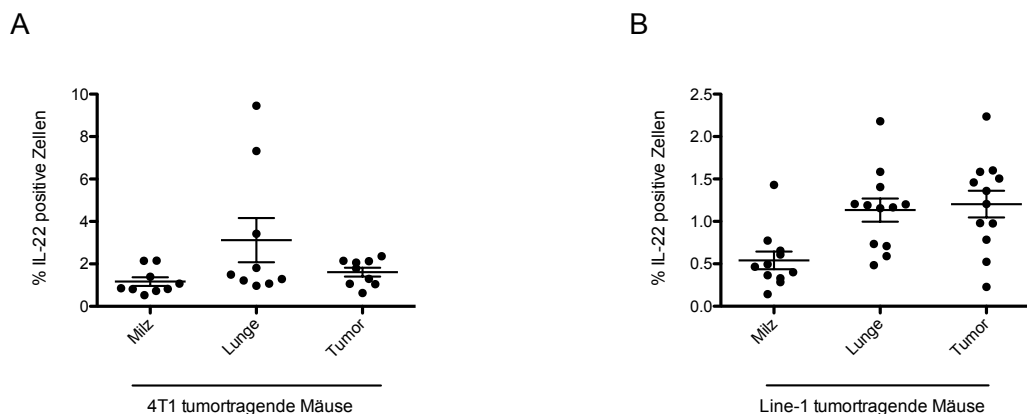
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur Rolle von IL-1 $\alpha$ in der durch Lungen- und Brusttumorzelllinien vermittelten IL-22-Induktion aus Splenozyten

#### 4.1.1 IL-22-Expression von Lymphozyten in 4T1 und Line-1 Tumoren *in vivo*

IL-22 wird von den meisten Tumorgeweben, darunter auch Brust- und Lungentumoren, exprimiert (Kobold *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2014). Da die Quelle und Regulation von IL-22 in den beiden genannten Tumorentitäten in dieser Arbeit untersucht werden sollte, wurde zunächst die IL-22-Expression in 4T1 und Line-1 Tumorzellen analysiert.

In Abbildung 4 ist die Gesamtmenge der IL-22 positiven mononuklearen Zellen in Milz, Lunge und Tumor von Balb/c Mäusen nach subkutaner Injektion mit 4T1 (A) oder Line-1 Zellen (B) dargestellt. In 4T1 tumortragenden Mäusen wurden in der Milz 1,28 %, in der Lunge 3,65 % und im Tumor 1,66 % IL-22 positive Immunzellen identifiziert. Eine etwas niedrigere IL-22<sup>+</sup>-Zellpopulationen konnten im Line-1 Modell nachgewiesen werden mit 0,52 % in der Milz, 1,17 % in der Lunge und 1,03 % im Tumor.



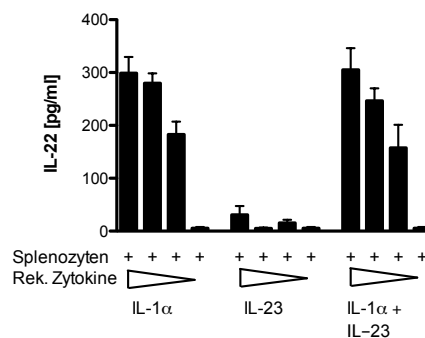
**Abbildung 4: Expression von IL-22 in tumortragenden Mäusen.** Injektion von (A)  $1,25 \times 10^5$  4T1 bzw. (B)  $5 \times 10^5$  Line-1 Tumorzellen s. c. in Balb/c Mäuse. Einzelzellsuspensionen von Milz, Lunge und Tumor wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt (A und B repräsentieren gepoolte Daten mit  $n = 3$  beziehungsweise  $n = 4$  unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  Mäusen pro Gruppe). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM.

Um die Quelle von IL-22 in beiden Tumormodellen aufzufindig machen zu können, hat ein früherer Doktorand unserer Arbeitsgruppe Splenozyten aus Balb/c Mäusen isoliert und mit einem Gemisch aus 50 % zellfreiem 4T1- oder Line-1-Tumorüberstand und RPMI<sup>+++</sup> stimuliert. Nach sechs Tagen wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA konnte eine starke IL-22-Induktion durch den Tumorüberstand nachgewiesen werden (Wenk 2016).



#### 4.1.2 Stimulation von Splenozyten mit IL-1 $\alpha$ und IL-23

In einem Zytokin-Array konnte unsere Arbeitsgruppe in der Vergangenheit zeigen, dass in Überständen stimulierter Splenozyten mit 4T1 oder Line-1 Tumorüberstand eine verstärkte IL-1 $\alpha$ , IL-23, IL-6, G-CSF, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  Expression vorhanden war. Daher wurden Splenozyten mit den genannten rekombinanten Zytokinen (20 ng/ml) für vier Tage stimuliert und deren IL-22-Expression mittels ELISA bestimmt. Nur nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  bzw. IL-23 konnte eine IL-22-Sekretion im Überstand nachgewiesen werden (Wenk 2016). Um den Effekt beider Zytokine auf die IL-22-Produktion weiter zu charakterisieren, wurden Splenozyten mit verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 und 0 ng/ml) von IL-1 $\alpha$ , IL-23 oder beiden Zytokinen für sechs Tage stimuliert und die resultierende IL-22-Induktion ermittelt. Bereits die niedrigste Konzentration von 0,1 ng/ml IL-1 $\alpha$  konnte IL-22 induzieren, dies stieg dosisabhängig an. Wurde zusätzlich IL-23 zugegeben konnte ein geringer additiver Effekt der IL-22-Expression beobachtet werden. IL-23 alleine führte zu einer sehr niedrigen IL-22-Ausschüttung (Abbildung 5).



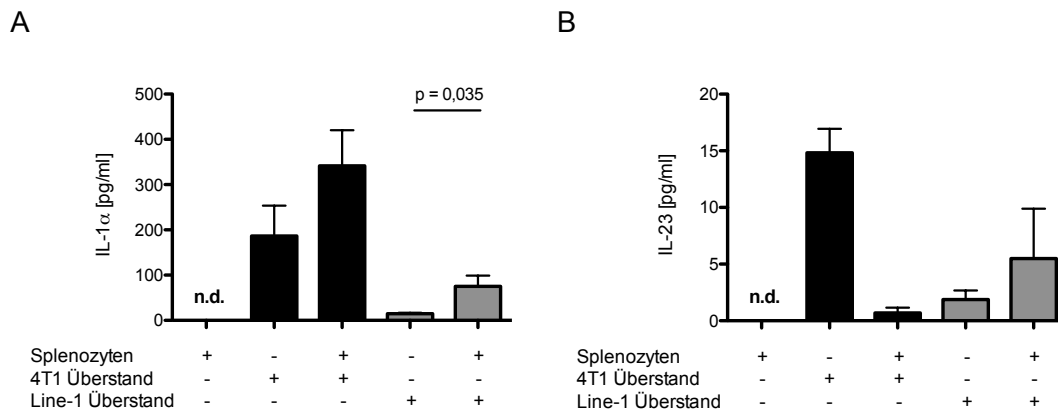
**Abbildung 5: Stimulation von Splenozyten mit rekombinanten Zytokinen.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 10, 1, 0,1 und 0 ng/ml IL-1 $\alpha$ , IL-23 oder beiden Zytokinen. Nach sechs Tagen Stimulation wurde im Überstand die IL-22-Konzentration mittels ELISA bestimmt ( $n = 4$  unabhängige Experimente). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM.

#### 4.1.3 Expression der Zytokine IL-1 $\alpha$ und IL-23 in den Tumorzelllinien Line-1 und 4T1

Um die Daten des Zytokin-Arrays zu bestätigen, wurden Splenozyten mit dem zellfreien Überstand von 4T1 oder Line-1 Tumorzelllinien inkubiert und die IL-1 $\alpha$  und IL-23 Konzentration in den resultierenden Überständen gemessen. In beiden Tumorzellüberständen konnte sowohl IL-1 $\alpha$  (Abbildung 6 A) als auch IL-23 (Abbildung 6 B) nachgewiesen werden. Die Sekretion beider Zytokine war von 4T1 Zellen, im Vergleich zu Line-1 Zellen stärker. Die Stimulation der Splenozyten mit Tumorzellüberständen führte zu

einer höheren IL-1 $\alpha$  Freisetzung durch die Splenozyten. IL-23 wurde durch die Stimulation nicht zusätzlich induziert.

Des Weiteren wurde die Expression beider Zytokine in Proteinlysaten der Tumorzellen mittels ELISA und qRTPCR bestimmt. Auf RNA und Proteinebene konnte sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-23 nachgewiesen werden, auch hier war die Expression der 4T1 Tumorzellen stärker (Daten nicht gezeigt).



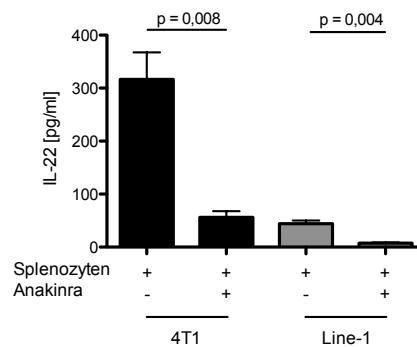
**Abbildung 6: Analyse von IL-1 $\alpha$  und IL-23 vor und nach Stimulation mittels Tumorzellüberstand.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 4T1 oder Line-1 Tumorzellüberstand. Die IL-1 $\alpha$  (A) und IL-23 (B) Sekretion im Überstand wurde nach sechs Tagen Stimulation mittels ELISA untersucht. (A und B repräsentieren  $n = 5$  unabhängige Experimente). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test. n. d. steht für nicht detektierbar.

#### 4.1.4 Neutralisation von IL-1 $\alpha$ und IL-23 führt zu einer Reduktion der IL-22-Expression

In Vorversuchen wurde ein neutralisierender anti-IL-1 $\alpha$ , anti-IL-23 oder beide Antikörper zu 4T1 oder Line-1 Überständen zugegeben und Splenozyten stimuliert. Nach Inkubation der Überstände mit neutralisierendem anti-IL-1 $\alpha$  oder beiden Antikörpern konnte nur noch eine geringe Menge IL-22 nach Stimulation nachgewiesen werden. Die Zugabe des anti-IL-23-Antikörpers führte zu keiner signifikanten IL-22-Reduktion in beiden Tumormodellen (Wenk, 2016).

Um diesen Effekt unabhängig zu bestätigen, sollte nun analysiert werden, ob eine Neutralisation von IL-1 im Tumorüberstand zu einer Reduktion der IL-22-Sekretion führt. Durch Zugabe des löslichen IL-1-Rezeptor Antagonisten Anakinra zu beiden Überständen konnte die IL-22-Sekretion aus Splenozyten blockiert werden (Abbildung 7). Anakinra bindet

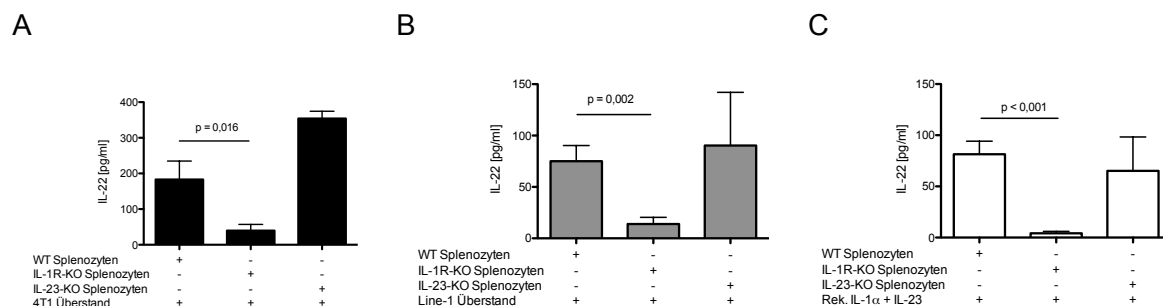
kompetitiv am IL-1-Rezeptor (IL-1R), wodurch es die biologische Aktivität von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hemmt.



**Abbildung 7: Neutralisation von IL-1 im Tumorüberstand.** Inkubation der Tumorüberstände 4T1 und Line-1 mit Anakinra (500 ng/ml) und anschließender Stimulation der Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) für sechs Tage. Analyse der IL-22-Sekretion im Überstand mittels IL-22 ELISA (n = 3 unabhängige Experimente). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

#### 4.1.5 Einfluss des IL-1-Signalwegs auf die IL-22-Induktion

Um den Einfluss von IL-1 auf die Induktion von IL-22 durch die Tumorzelllinien 4T1 (Abbildung 8 A) und Line-1 (Abbildung 8 B) zu untersuchen, wurden Splenozyten aus C57Bl/6 WT mit C57Bl/6 IL-1R-KO Mäusen verglichen. Außerdem wurden die Splenozyten zusätzlich mit den rekombinanten Zytokinen IL-1 $\alpha$  und IL-23 (Abbildung 8 C) stimuliert. Die IL-22-Sekretion war nach Stimulation der IL-1R-KO Splenozyten signifikant reduziert.

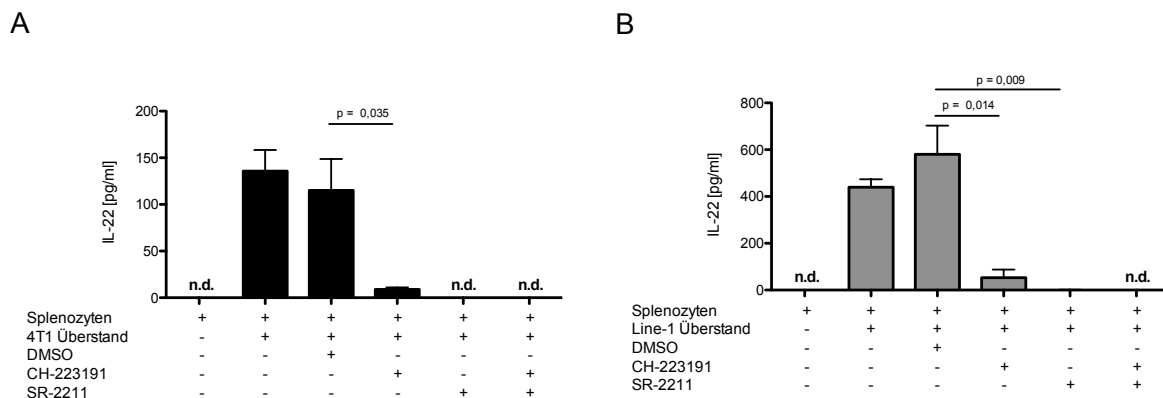


**Abbildung 8: Einfluss des IL-1-Signalweges auf die IL-22-Induktion.** Stimulation von C57Bl/6 WT oder IL-1R-KO Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit (A) Line-1, (B) 4T1 Tumorzellüberstand oder (C) rekombinantem IL-1 $\alpha$  und IL-23 (20 ng/ml) für sechs Tage. Analyse der IL-22-Konzentration im Überstand mittels IL-22 ELISA (A, B und C repräsentieren n = 2 unabhängige Experimente mit n = 4 bis 7 Mäuse pro Gruppe). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

## 4.2 Die Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t sind für die Tumorzell-induzierte IL-22-Produktion verantwortlich

### 4.2.1 Einfluss der Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t auf die IL-22-Sekretion nach Stimulation von Splenozyten mit Tumorüberstand

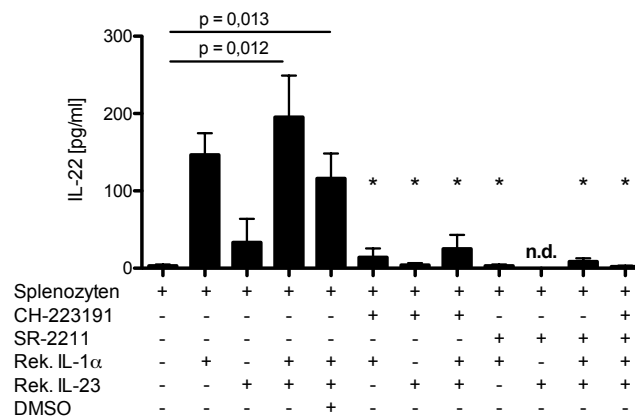
Um den Mechanismus der IL-22-Induktion durch Tumorzellen näher zu analysieren, sollten die verantwortlichen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die beiden Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t sind sowohl für die Differenzierung von verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen, als auch für deren IL-22-Produktion relevant (siehe Tabelle 1). Um den Einfluss von AhR und ROR $\gamma$ t auf die Tumor-induzierte IL-22-Sekretion zu untersuchen, wurden Splenozyten mit Tumorüberstand von 4T1 (Abbildung 9 A) oder Line-1 (Abbildung 9 B) Zellen stimuliert und gleichzeitig Antagonisten gegen AhR (CH-223191), ROR $\gamma$ t (SR-2211) einzeln oder beide gleichzeitig zugegeben. Auf RNA (Daten nicht gezeigt), wie auf Proteinebene scheinen beide Transkriptionsfaktoren für die IL-22-Expression notwendig zu sein, da im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO kein IL-22 nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 9: Antagonisierung von AhR und ROR $\gamma$ t, während der Stimulation von Splenozyten mit Tumorzellüberstand.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit zellfreiem (A) Line-1 oder (B) 4T1 Überstand, sowie Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  CH-223191 (AhR Antagonist),  $5 \mu\text{M}$  SR-2211 (ROR $\gamma$ t Antagonist) oder beiden Antagonisten. Messung der IL-22-Konzentration mittels ELISA nach sechs Tagen Inkubation (A repräsentiert  $n = 3$  unabhängige Experimente, B repräsentiert  $n = 1$  aus fünf unabhängigen Experimenten). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test. n. d. steht für nicht detektierbar.

Nach Zugabe von IL-1 $\alpha$  und IL-23 zu Splenozyten konnte nach sechs Tagen eine starke IL-22-Expression im Überstand mittels ELISA nachgewiesen werden. Nach Zugabe von Antagonisten gegen die Transkriptionsfaktoren AhR (CH-223191) oder ROR $\gamma$ t (SR-2211) zur Zytokin-Stimulation der Splenozyten wurde die IL-22-Expression signifikant herabreguliert.

Wurden beide Antagonisten eingesetzt konnte fast keine IL-22-Sekretion festgestellt werden (Abbildung 10).



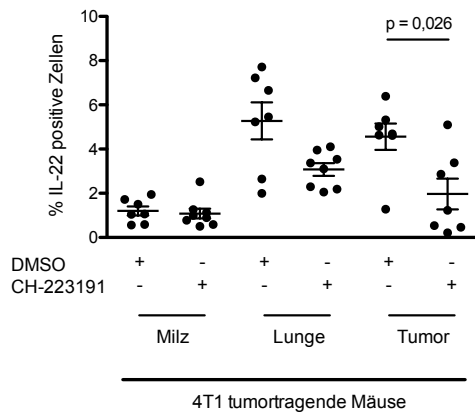
**Abbildung 10: Antagonisierung von AhR und ROR $\gamma$ t, während der Stimulation mit IL-1 $\alpha$  und IL-23.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit rekombinantem IL-1 $\alpha$  und IL-23 (20 ng/ml), sowie Zugabe von 10  $\mu$ M AhR (CH-223191), 5  $\mu$ M ROR $\gamma$ t (SR-2211) oder beiden Antagonisten. Messung der IL-22-Expression mittels ELISA nach sechs Tagen Inkubation (es sind gepoolte Daten von  $n = 4$  unabhängige Experimente gezeigt). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgt mit dem zweiseitigen Student's t-Test. n. d. steht für nicht detektierbar.

Um ausschließen zu können, dass die beiden Antagonisten CH-223191 und SR-2211 das Überleben der Splenozyten beeinflussen und dadurch die verringerte IL-22-Expression zustande kommt, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. LDH wird in Folge der Apoptose ausgeschüttet und kann photometrisch bestimmt werden. Es konnte kein Unterschied in der LDH Ausschüttung festgestellt werden. Somit haben die Antagonisten CH-223191 und SR-2211 keinen Einfluss auf das Überleben der Splenozyten (Daten nicht gezeigt).

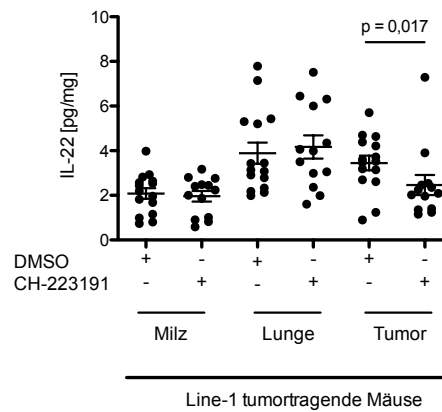
#### 4.2.2 Die IL-22-Sekretion von Immunzellen ist *in vivo* vom Transkriptionsfaktor AhR abhängig

Da tumorinfiltrierte Immunzellen aus 4T1 und Line-1 Tumoren IL-22 exprimieren, sollte geklärt werden, ob der Transkriptionsfaktor AhR (CH-223191) auch *in vivo* für die IL-22-Produktion im Tumor verantwortlich ist. Hierfür wurden 4T1 und Line-1 tumortragende Mäuse mit dem AhR-Antagonisten CH-223191 behandelt. Die IL-22-Expression im Tumor von 4T1 und Line-1 tumortragenden Mäusen nahm nach Gabe des AhR Antagonisten signifikant ab (Abbildung 11 A und B).

A



B

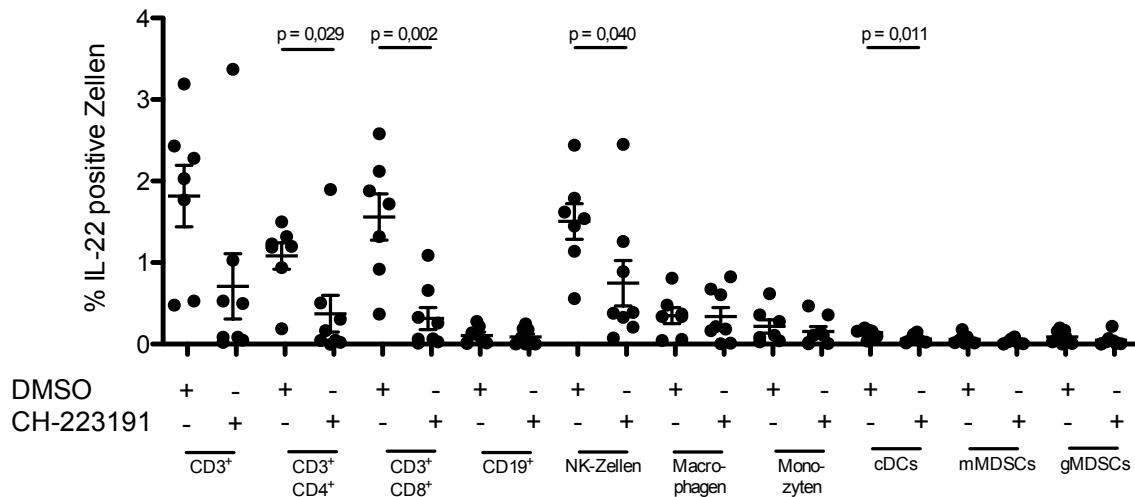


### Abbildung 11: Einfluss des Transkriptionsfaktors AhR auf die IL-22-Produktion *in vivo*.

IL-22-Sekretion in Milz, Lunge und Tumor nach s. c. Injektion von (A)  $1,25 \times 10^5$  4T1 oder (B)  $5 \times 10^5$  Line-1 Tumorzellen. Analyse der IL-22-produzierenden Zellen mittels (A) Durchflusszytometrie oder (B) ELISA. Injektion von 10  $\mu$ M CH-223191 oder DMSO i. p. an (A) zwei oder (B) sieben aufeinanderfolgenden Tagen vor Versuchsende. Einzelzell-suspensionen von Milz, Lunge und Tumor wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt. (A repräsentiert gepoolte Daten von  $n = 2$  unabhängige Experimente mit  $n = 4$  Mäusen pro Gruppe; B repräsentiert gepoolte Daten von  $n = 3$  unabhängige Experimente mit  $n = 5$  Mäusen pro Gruppe). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Weiterhin wurden die 4T1 Tumore auf verschiedene IL-22-sezernierende

Immunzellsubpopulationen untersucht. Nach Behandlung mit dem AhR-Antagonisten, wurde die IL-22-Expression in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen, sowie in NK-Zellen und cDCs signifikant herabreguliert (Abbildung 12).



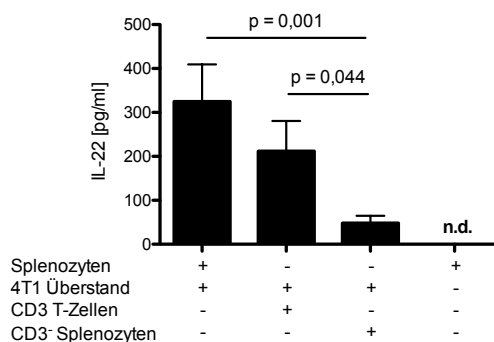
**Abbildung 12: Einfluss des Transkriptionsfaktors AhR auf die IL-22-Produktion einzelner Subpopulationen im 4T1 Tumormodell.** IL-22-Sekretion im Tumor nach s. c. Injektion von  $1,25 \times 10^5$  4T1 Tumorzellen. Injektion von 10  $\mu$ M CH-223191 oder DMSO i. p. an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor Versuchsende. Analyse der IL-22-produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie. Einzelzell-Suspensionen von Milz, Lunge und Tumor wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt. Es wurden folgende IL-22-produzierende Immunzellsubpopulationen analysiert: NK-Zellen (Nkp46<sup>+</sup>), Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>), Monozyten (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>), cDCs (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>Gr1<sup>-</sup>), mMDSCs (CD11b<sup>med</sup>Gr1<sup>med</sup>Ly6C<sup>+</sup>) und gMDSCs (CD11b<sup>high</sup>Gr1<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>) (es werden gepoolte Daten von n = 2 unabhängige Experimente mit n = 4 Mäusen pro Gruppe gezeigt). Falls die IL-22 positiven Zellen unter 0,05 % lagen wurden diese ausgeschlossen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

### 4.3 Murine Tumorzellen induzieren die IL-22-Sekretion aus einer gemischten T-Helfer Zellpopulation

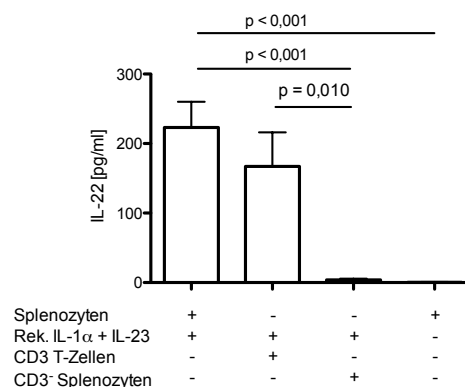
#### 4.3.1 IL-22 wird von CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Tumorzellüberstand und rekombinanten Zytokinen sezerniert

Basierend auf der Literatur gelten T-Zellen als Hauptquelle von IL-22 in Maus und Mensch (siehe Tabelle 1). Im Folgenden sollte daher geprüft werden, ob T-Zellen IL-22 nach Stimulation mit Tumorzellüberstand (Abbildung 13 A) oder mit rekombinantem IL-1 $\alpha$  und IL-23 (Abbildung 13 B) produzieren. Die Reinheit der eingesetzten CD3<sup>+</sup> Zellen lag zwischen 90 und 98 % und die der CD3<sup>-</sup> Zellen bei unter 2 % (Daten nicht gezeigt). Nur CD3<sup>+</sup> Immunzellen waren in der Lage nach Stimulation IL-22 zu produzieren (Abbildung 13 A und B). Somit sind T-Zellen die Hauptproduzenten der IL-22-Produktion nach Stimulation mit 4T1 Tumorüberstand oder IL-1 $\alpha$  und IL-23 Zytokinen.

A



B



#### Abbildung 13: Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellpopulation.

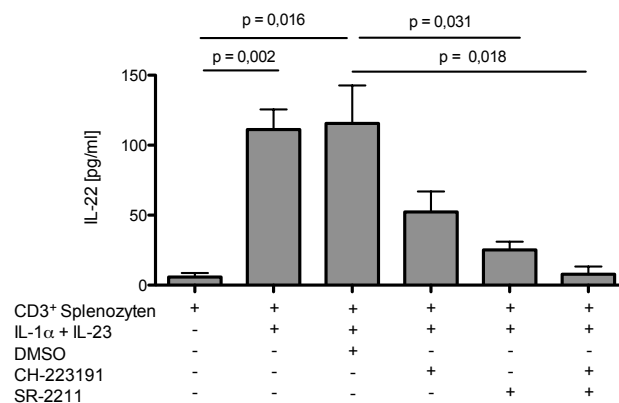
Stimulation von Splenozyten, sowie von MACS angereicherten CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> Immunzellsubpopulationen ( $2 \times 10^6$ /ml) für sechs Tage mit (A) 4T1 Tumorzellüberstand oder (B) rekombinantem IL-1 $\alpha$  und IL-23 (100 ng/ml). Analyse der IL-22-Konzentration im Überstand mittels ELISA (A repräsentiert gepoolte Daten aus n = 6 und B aus n = 5 unabhängigen Experimenten). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test. n. d. steht für nicht detektierbar.

#### 4.3.2 Die IL-22-Produktion von T-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem IL-1 $\alpha$ und IL-23 ist von den Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t abhängig

Im Folgenden sollte die Abhängigkeit der IL-22-Produktion durch T-Zellen von den beiden Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t untersucht werden. Durch Hinzufügen eines oder



beider Antagonisten zu den T-Zell-Stimulationen konnte eine signifikante Reduktion der IL-22-Sekretion erzielt werden (Abbildung 14).

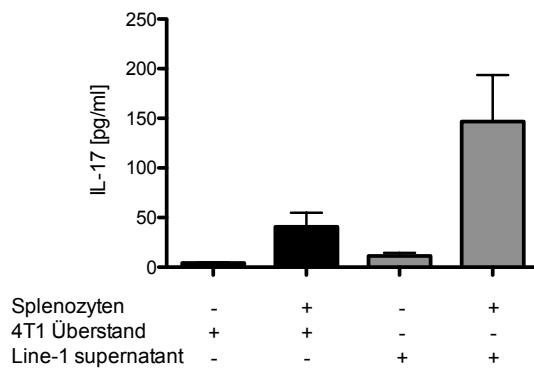


**Abbildung 14: Antagonisierung von AhR und RORyt in CD3<sup>+</sup> Zellen, während der Stimulation mit IL-1α und IL-23.** Stimulation von Splenozyten und MACS-angereicherten CD3<sup>+</sup> Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) für sechs Tage mit rekombinantem IL-1α und IL-23 (100 ng/ml), in An- oder Abwesenheit von 10 μM CH-223191 (AhR Antagonist), 5 μM SR-2211 (RORyt Antagonist) oder beider Antagonisten. Analyse der IL-22-Konzentration im Überstand mittels ELISA (es werden gepoolte Daten aus  $n = 3$  unabhängige Experimente gezeigt). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

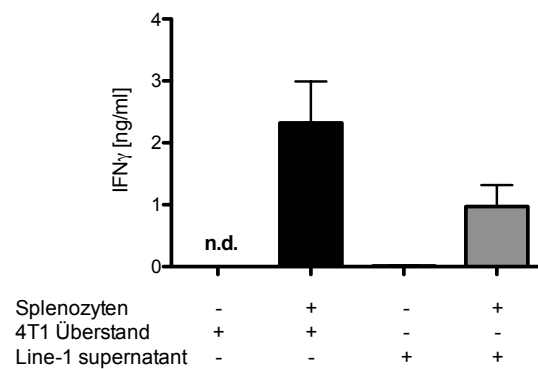
#### 4.3.3 IL-22-Sekretion von eine gemischte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population

Um die T-Zell-Population, welche IL-22 produziert weiter charakterisieren zu können, wurde der Überstand nach Stimulation auf IL-17 und IFNγ Sekretion analysiert. IFNγ gilt als prototypisch für Th1 und IL-17 für Th17 Zellen. Nach Stimulation der Splenozyten mit 4T1 oder Line-1 Tumorzellüberstand konnte sowohl IL-17 (Abbildung 15 A) als auch IFNγ (Abbildung 15 B) nachgewiesen werden.

A



B

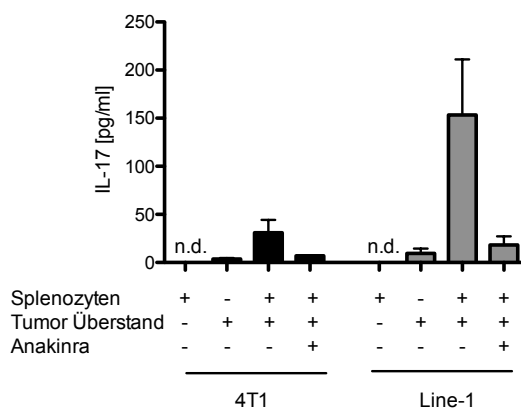


**Abbildung 15: Produktion von IFN $\gamma$  und IL-17 nach Stimulation der Splenozyten mit Tumorzellüberstand.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit zellfreiem 4T1 oder Line-1 Tumorzellüberstand für sechs Tage. Quantifizierung von IFN $\gamma$  und IL-17 im Überstand mittels ELISA (A repräsentiert gepoolte Daten aus  $n = 5$  und B aus  $n = 7$  unabhängigen Experimenten). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM; n. d. steht für nicht detektierbar.

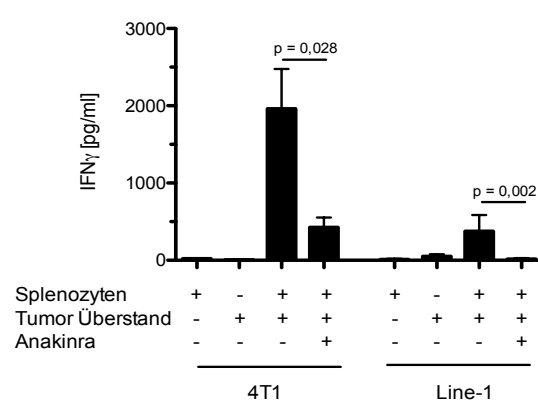
#### 4.3.4 Die IL-17 und IFN $\gamma$ Sekretion aus Th1, Th17 und Th22 -Zellen ist von IL-1 abhängig

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die IL-22-Sekretion der IL-17 und IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen IL-1 abhängig ist. Nach Stimulation der Splenozyten und Zugabe von Anakinra wurde der Überstand auf IL-17 (Abbildung 16 A) und IFN $\gamma$  (Abbildung 16 B) Sekretion analysiert. Durch Anakinra wurde die Produktion beider Zytokine stark verringert was darauf hindeutet, dass keine Th1, Th17 und Th22 Zellen vorhanden sind.

A



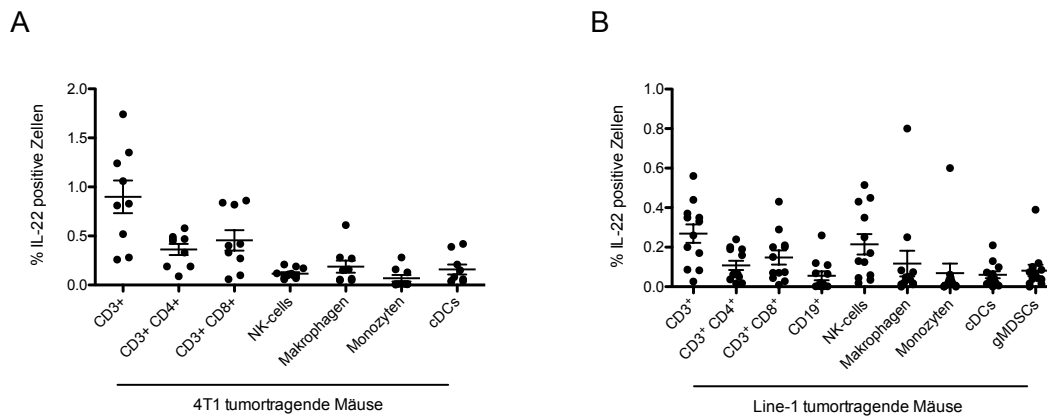
B



**Abbildung 16: Die IL-17 und IFN $\gamma$  Sekretion aus Th1, Th17 und Th22 -Zellen ist von IL-1 abhängig.** Stimulation von Splenozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) mit zellfreiem 4T1 oder Line-1 Tumorzellüberstand für sechs Tage, mit oder ohne Anakinra (500 ng/ml). Quantifizierung von IFN $\gamma$  und IL-17 im Überstand mittels ELISA (A und B repräsentieren 4T1  $n = 4$  und Line-1  $n = 3$  verschiedene Überstände). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test. n. d. steht für nicht detektierbar.

#### 4.3.5 Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulationen *in vivo*

Nach subkutaner Injektion von 4T1 oder Line-1 Tumorzellen in Balb/c Mäuse wurden die tumorinfiltrierten Immunzellen auf ihre IL-22-Sekretion untersucht. In Abbildung 17 A und B wurde zunächst die Gesamtmenge an Immunzellen bestimmt und anschließend davon ausgehend die Anzahl der IL-22-positiven Zellen anhand der Gesamtzellpopulation berechnet. In beiden Tumormodellen wurde IL-22 hauptsächlich von T-Zellen exprimiert, wobei auch myeloide Zellen IL-22 exprimieren. Vor allem im Line-1 Modell wurde IL-22 verstärkt von NK-Zellen sezerniert. Des Weiteren waren IL-17 positive Zellen in den 4T1 und Line-1 Tumoren vorhanden (Daten nicht gezeigt). Im 4T1 Tumormodell wurde IL-22 nicht von B-Zellen oder *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), im Line-1 Tumormodell nicht von monozytoiden MDSCs (mMDSCs) produziert.



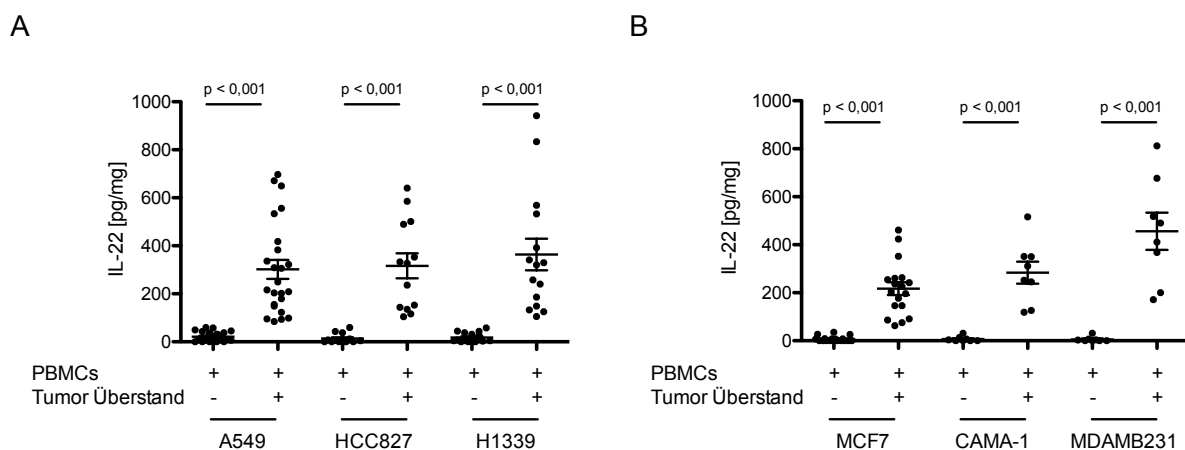
**Abbildung 17: IL-22-produzierende Immunzellsubpopulationen *in vivo*.**

IL-22-Expression von verschiedenen Immunzellsubpopulationen im Tumor nach Injektion von (A)  $1,25 \times 10^5$  4T1 oder (B)  $5 \times 10^5$  Line-1 Tumorzellen in Balb/c Mäuse. Einzelzell-suspensionen des Tumors wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt. Analyse mittels Durchfluss-zytometrie von IL-22-exprimierenden NK-Zellen (Nkp46<sup>+</sup>), Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>), Monozyten (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>), cDCs (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>Gr1<sup>-</sup>), und gMDSCs (CD11b<sup>high</sup>Gr1<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>) (A und B repräsentieren gepoolte Daten aus  $n = 3$  und  $n = 4$  unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  Mäusen pro Gruppe). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM.

#### 4.4 Humane Lungen- und Brusttumorzelllinien induzieren IL-22-Sekretion von PBMCs, in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und den Transkriptionsfaktoren AhR- und ROR $\gamma$ t

##### 4.4.1 Lösliche Faktoren aus humanen Lungen- und Brusttumorzellen können IL-22-Sekretion aus PBMCs initiieren

Um zu untersuchen ob auch humane Tumorzelllinien in der Lage sind IL-22 aus Immunzellen zu induzieren, wurden mononukleäre periphere Blutzellen (PBMCs) aus verschiedenen gesunden Spendern isoliert und mit dem Überstand von drei unterschiedlichen humanen Lungen- (A549, HCC827827, H1339) und Brust- (MCF7, CAMA1, MDAMB231) Tumorzelllinien stimuliert. Nach Stimulation mit den verschiedenen Tumorzellüberständen konnte jeweils eine signifikante IL-22-Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 18 A und B).



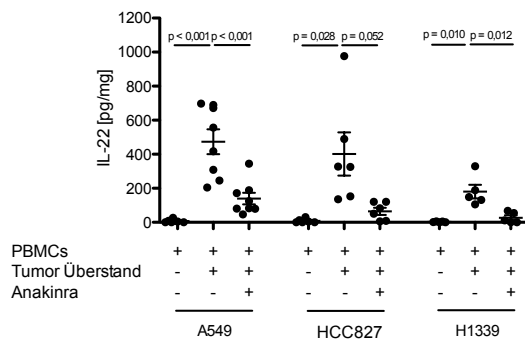
**Abbildung 18: Stimulation von PBMCs mit humanem Lungen- und Brusttumorzellüberstand.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 50 % zellfreiem (A) A549, HCC827, H1339 (B) MCF7, CAMA1 oder MDAMB231 Tumorzellüberstand und 50 % PBMC Medium für sechs Tage. Messung der IL-22-Konzentration mittels ELISA (A repräsentiert 13 bis 24 und B 8 bis 18 verschiedene Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

##### 4.4.2 Die IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Tumorzellüberständen ist von IL-1 $\beta$ abhängig

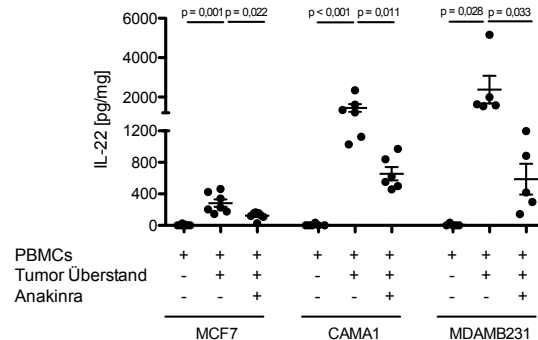
Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die IL-22-Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  abhängig ist. Aus diesem Grund wurde zunächst der IL-1-Antagonist Anakinra, welcher den IL-1R-Signalweg hemmt, zu den humanen Lungen- und Brust-Tumorzellüberständen zugegeben. Anakinra blockierte die IL-22-Induktion, welche durch die Brust- und Lungentumorüberständen hervorgerufen wird (Abbildung 19 A und B). Hingegen hatte die

Neutralisation von IL-23 keinen Effekt auf die IL-22-Ausschüttung (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde die IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Expression der humanen Lungen- und Brusttumorzelllinien analysiert (Daten nicht gezeigt). IL-1 $\alpha$  wurde von allen Tumorzelllinien produziert wobei A549 und MCF7 die niedrigste Expression aufwiesen. IL-1 $\beta$  konnte nicht nachgewiesen werden.

A



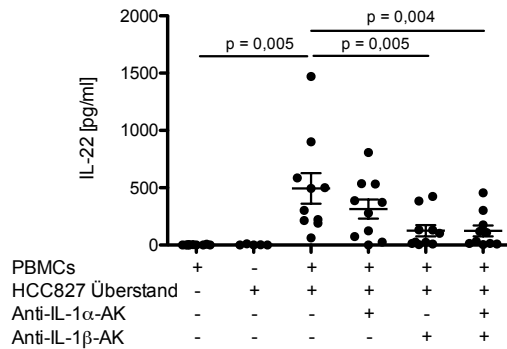
B



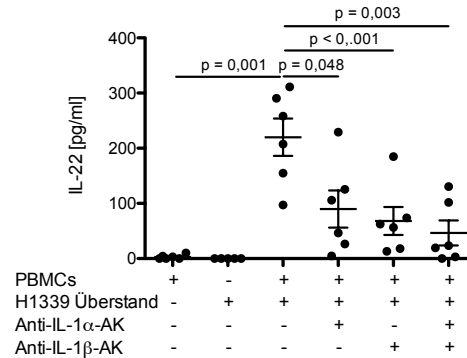
**Abbildung 19: Stimulation der PBMCs mit Tumorzellüberständen und Hemmung der IL-22-Produktion durch Zugabe von Anakinra.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 50 % zellfreiem (A) A549, HCC827, H1339 (B) MCF7, CAMA1 oder MDAMB231 Tumorzellüberstand und 50 % PBMC Medium für sechs Tage, sowie Zugabe von Anakinra (500 ng/ml). Messung der IL-22-Konzentration mittels ELISA (A repräsentiert  $n = 5$  bis 8 und B  $n = 5$  bis 7 verschiedene gesunde Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Um zusätzlich differenzieren zu können, ob die IL-22-Sekretion von IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  abhängt wurden PBMCs mit Tumorüberstand zweier Lungenzelllinien (HCC827 und H1339) stimuliert und neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  zugegeben. In beiden analysierten Zelllinien führte die Zugabe des Antikörpers gegen IL-1 $\beta$  zu einer starken Reduktion von IL-22 (Abbildung 20 A und B). Allerdings konnte die IL-22-Sekretion nach Stimulation mit H1339 Tumorzellüberstand auch durch anti-IL-1 $\alpha$  reduziert werden (Abbildung 20 B).

A



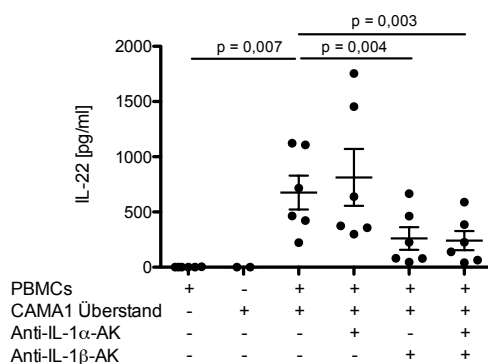
B



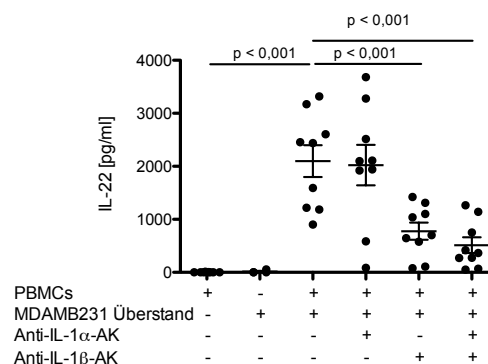
**Abbildung 20: Hemmung der IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Lungentumorzellüberständen durch anti-IL-1 $\alpha$  und anti-IL-1 $\beta$  Antikörper.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 50 % zellfreiem (A) HCC827 oder (B) H1339 Tumorzellüberstand für sechs Tage in der Gegenwart oder Abwesenheit von anti-IL-1 $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  oder beiden Antikörpern (10  $\mu$ g/ml). Messung der IL-22-Konzentration mittels ELISA (A repräsentiert  $n = 10$  und B  $n = 6$  verschiedene Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Weiterhin wurden PBMCs mit dem Überstand humaner Brustzelllinien (CAMA1 und MDAMB231) stimuliert und neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  zugegeben. In den beiden analysierten Zelllinien war IL-1 $\beta$  für die IL-22-Produktion notwendig, da die Zugabe des Antikörpers gegen IL-1 $\beta$ , nicht aber des gegen IL-1 $\alpha$  zu einer starken Reduktion der Expression von IL-22 führte (Abbildung 21 A und B).

A



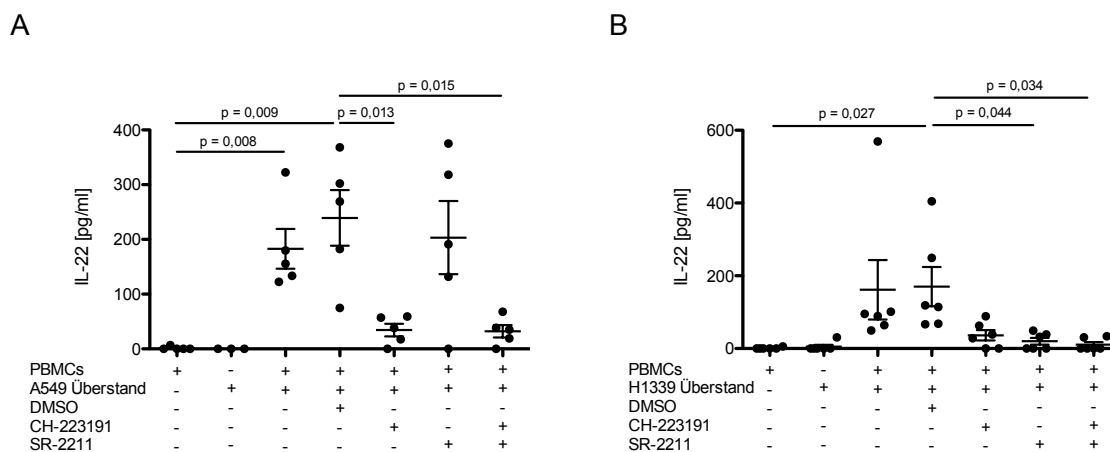
B



**Abbildung 21: Hemmung der IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Brusttumorzellüberständen durch anti-IL-1 $\alpha$  und anti-IL-1 $\beta$  Antikörper.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit 50 % zellfreiem (A) CAMA1 oder (B) MDAMB231 Tumorzellüberstand für sechs Tage in der Gegenwart oder Abwesenheit von anti-IL-1 $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  oder beiden Antikörpern (10  $\mu$ g/ml). Messung der IL-22-Konzentration mittels ELISA (A repräsentiert  $n = 6$  und B  $n = 9$  verschiedene Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

#### 4.4.3 Die IL-22-Produktion von PBMCs nach Stimulation mit Tumorzellüberständen ist von AhR- und RORyt abhängig

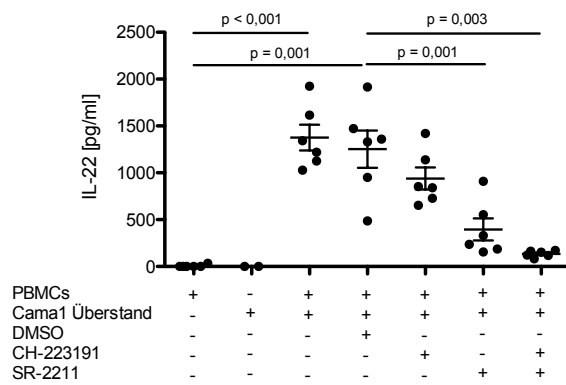
Nachdem die beiden Transkriptionsfaktoren AhR und RORyt im Mausmodell für die IL-22-Expression notwendig waren, sollte analysiert werden, ob dies auch auf humane Zellen übertragbar ist. Zusätzlich zur Stimulation mit humanem Lungentumorzellüberstand wurden 10  $\mu$ M CH-223191 (AhR-Antagonist), 5  $\mu$ M SR-2211 (RORyt-Antagonist) oder beide Antagonisten zugegeben. Nach Stimulation mit A549 Überstand (Abbildung 22 A) wurde die IL-22-Expression über den AhR Antagonisten signifikant reduziert. Im Fall einer Inkubation mit H1339 Überstand (Abbildung 22 B) wurde die IL-22-Sekretion über die Zugabe eines oder beider Antagonisten signifikant reduziert.



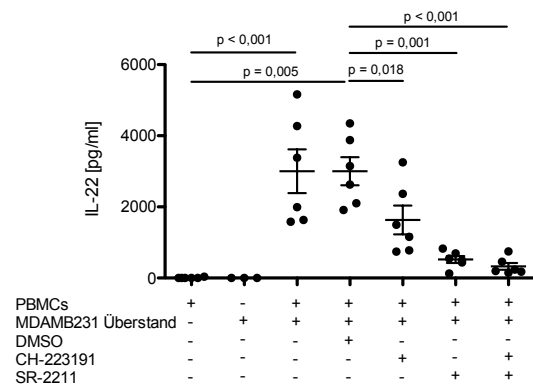
**Abbildung 22: Antagonisierung der IL-22-Sekretion aus PBMCs nach Stimulation mit Lungentumorzellüberstand mittels AhR- und RORyt-Antagonisten.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit (A) A549 oder (B) H1339 Tumorzellüberstand, sowie Zugabe von 10  $\mu$ M CH-223191 (AhR-Antagonist), 5  $\mu$ M SR-2211 (RORyt-Antagonist) oder beiden Antagonisten. Die IL-22-Konzentration wurde nach sechs Tagen im Überstand mittels ELISA nachgewiesen (A repräsentiert  $n = 5$  und B  $n = 6$  verschiedene Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Des Weiteren wurden zusätzlich zur Stimulation mit humanem Brusttumorzellüberstand 10  $\mu$ M CH-223191 (AhR-Antagonist), 5  $\mu$ M SR-2211 (RORyt-Antagonist) einzeln oder beide Antagonisten zugegeben. Die Induktion von IL-22 konnte durch die Zugabe einer der beiden Antagonisten vollständig auf das Expressionslevel ohne Stimulation reduziert werden. Eine signifikante Reduktion von IL-22 nach Stimulation mit CAMA1 Überstand (Abbildung 23 A) wurde über die Antagonisierung des RORyt-Antagonisten erreicht. Durch eine Inkubation mit MDAMB231 Überstand (Abbildung 23 B) wurde die IL-22-Sekretion über die Zugabe eines oder beider Antagonisten signifikant reduziert.

A



B



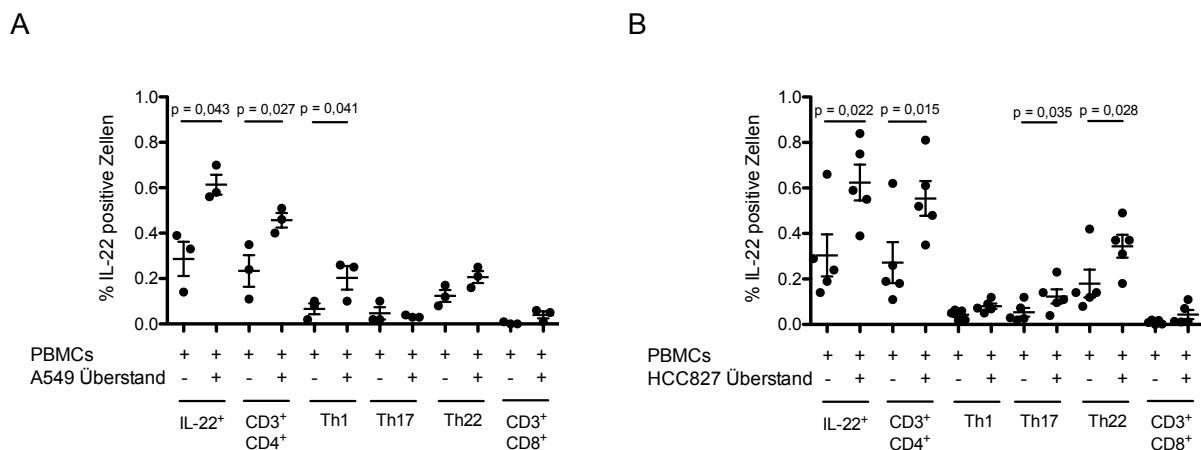
**Abbildung 23: Antagonisierung der IL-22-Sekretion aus PBMCs nach Stimulation mit Brusttumorzellüberstand mittels AhR- und RORyt-Antagonisten.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit CMA1 (A) oder MDAMB231 (B) Tumorzellüberstand, sowie Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  CH-223191 (AhR-Antagonist),  $5 \mu\text{M}$  SR-2211 (RORyt-Antagonist) einzeln oder zusammen. Die IL-22-Konzentration wurde nach sechs Tagen im Überstand mittels ELISA nachgewiesen (A und B repräsentieren  $n = 6$  verschiedene Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.



## 4.5. Humane Brust und Lungentumorzelllinien induzieren IL-22 aus einer gemischten T-Helfer Zellpopulation

### 4.5.1 Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulation nach Stimulation mit humanem Tumorzellüberstand

Im Folgenden sollte die IL-22-sezernierende Immunzellsubpopulation nach Stimulation mit humanem Lungentumorzellüberstand identifiziert werden. Nach Inkubation mit den verschiedenen Tumorzellüberständen konnte jeweils eine signifikante IL-22-Induktion nachgewiesen werden, welche hauptsächlich von  $CD4^+$  T-Zellen bestehend aus Th1, Th17 und Th22 Zellen, ausging (Abbildung 24 A und B). Weder  $CD11b^+$  noch  $\gamma\delta$  T-Zellen sezernierten IL-22 nach Stimulation mit den Tumorzellüberständen (Daten nicht gezeigt).

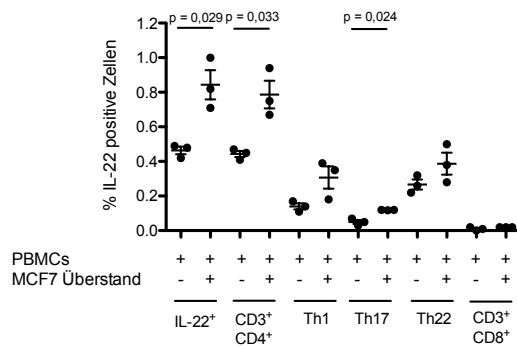


#### Abbildung 24: Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulation.

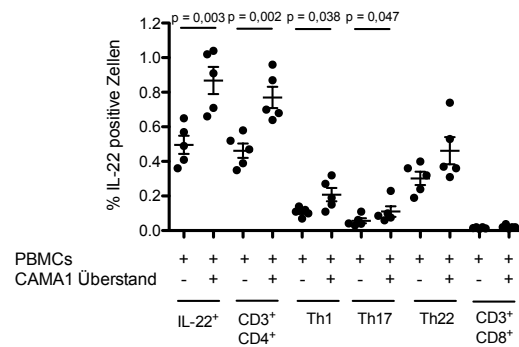
Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6$ /ml) mit (A) A549 oder (B) HCC827 Tumorzellüberstand für vier bis sechs Tage. Stimulierte PBMCs wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt. Analyse der IL-22-Expression mittels Durchflusszytometrie von  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen, Th1 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$ ), Th17 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+IL-17^+$ ), Th22 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+IL-17^-$ ) sowie  $CD11b^+$  Zellen (A repräsentiert  $n = 3$  und B  $n = 5$  verschiedene gesunde Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Falls die IL-22 positiven Zellen unter 0,05 % lagen wurden diese ausgeschlossen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Anschließend wurden die IL-22-sezernierenden Immunzellsubpopulationen nach Stimulation mit humanem Brusttumorzellüberstand (MCF7 und CAMA1) identifiziert. Ähnlich der Stimulation mit Lungentumorüberständen konnte eine signifikante IL-22-Induktion hauptsächlich ausgehend von  $CD4^+$  T-Zellen (Th1, Th17 und Th22 Zellen), beobachtet werden (Abbildung 25 A und B). Weder  $CD11b^+$  noch  $\gamma\delta$  T-Zellen sezernierten IL-22 nach Stimulation mit den Tumorzellüberständen (Daten nicht gezeigt).

A



B



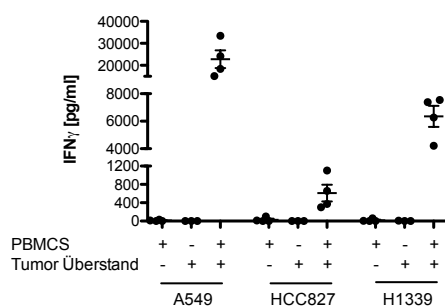
### Abbildung 25: Identifikation der IL-22-produzierenden Immunzellsubpopulation.

Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit (A) MCF7 oder (B) Cama1 Tumorzellüberstand für vier bis sechs Tage. Stimulierte PBMCs wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär für IL-22 gefärbt. Analyse der IL-22-Expression mittels Durchflusszytometrie von  $\text{CD}8^+$  und  $\text{CD}4^+$  T-Zellen, Th1 ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{IFN}\gamma^+$ ), Th17 ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{IFN}\gamma^-\text{IL-17}^+$ ), Th22 ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{IFN}\gamma^-\text{IL-17}^-$ ) sowie  $\text{CD}11b^+$  Zellen (A repräsentiert  $n = 3$  und B  $n = 5$  verschiedene gesunde Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Falls die IL-22 positiven Zellen unter 0,05 % lagen wurden diese ausgeschlossen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

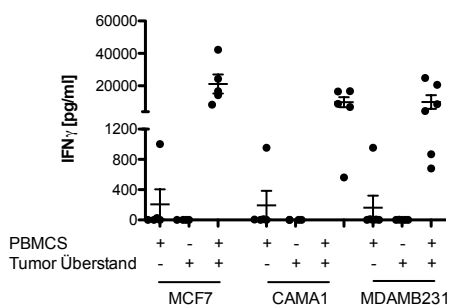
#### 4.5.2 IL-17 und $\text{IFN}\gamma$ Sekretion von T-Helfer Zellen durch Stimulation mit Tumorzellüberstand

Um die T-Zell-Population, welche IL-22 produziert weiter charakterisieren zu können, wurde der Überstand nach Stimulation der PBMCs auf  $\text{IFN}\gamma$  (Abbildung 26 A und B) und IL-17 (Abbildung 27 A und B) Sekretion analysiert. Somit konnte zwischen  $\text{IFN}\gamma$  produzierenden Th1 und IL-17 sezernierenden Th17 Zellen unterschieden werden.  $\text{IFN}\gamma$  und IL-17 Sekretion konnte in allen analysierten Überständen nach Stimulation nachgewiesen werden.

A

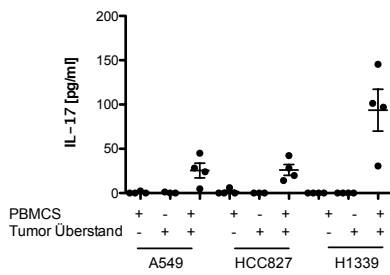


B

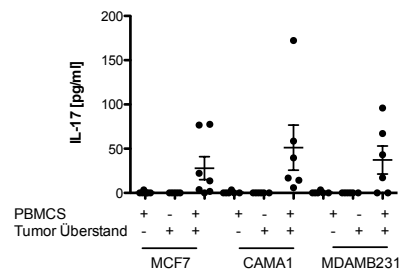


**Abbildung 26:  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion von T-Helfer Zellen durch Stimulation mit Tumorzellüberstand.** Stimulation von PBMCs ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit (A) A549, HCC827 und H1339, sowie mit (B) MCF7, CAMA1 und MDAMB231 Tumorzellüberstand für sechs Tage. Analyse der IL-22-Konzentration mittels  $\text{IFN}\gamma$  ELISA (A repräsentiert  $n = 4$  und B  $n = 5$  gesunde Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM.

A



B



**Abbildung 27: IL-17 Sekretion von T-Helfer Zellen durch Stimulation mit Tumorzellüberstand.** Stimulation von PBMCS ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit (A) A549, HCC827 und H1339, sowie mit (B) MCF7, CAMA1 und MDAMB231 Tumorzellüberstand für sechs Tage. Analyse der IL-22-Konzentration mittels IL-17 ELISA (A repräsentiert  $n = 4$  und B  $n = 4$  bis 6 gesunde Spender; jeder Punkt stellt einen individuellen Spender dar). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM.

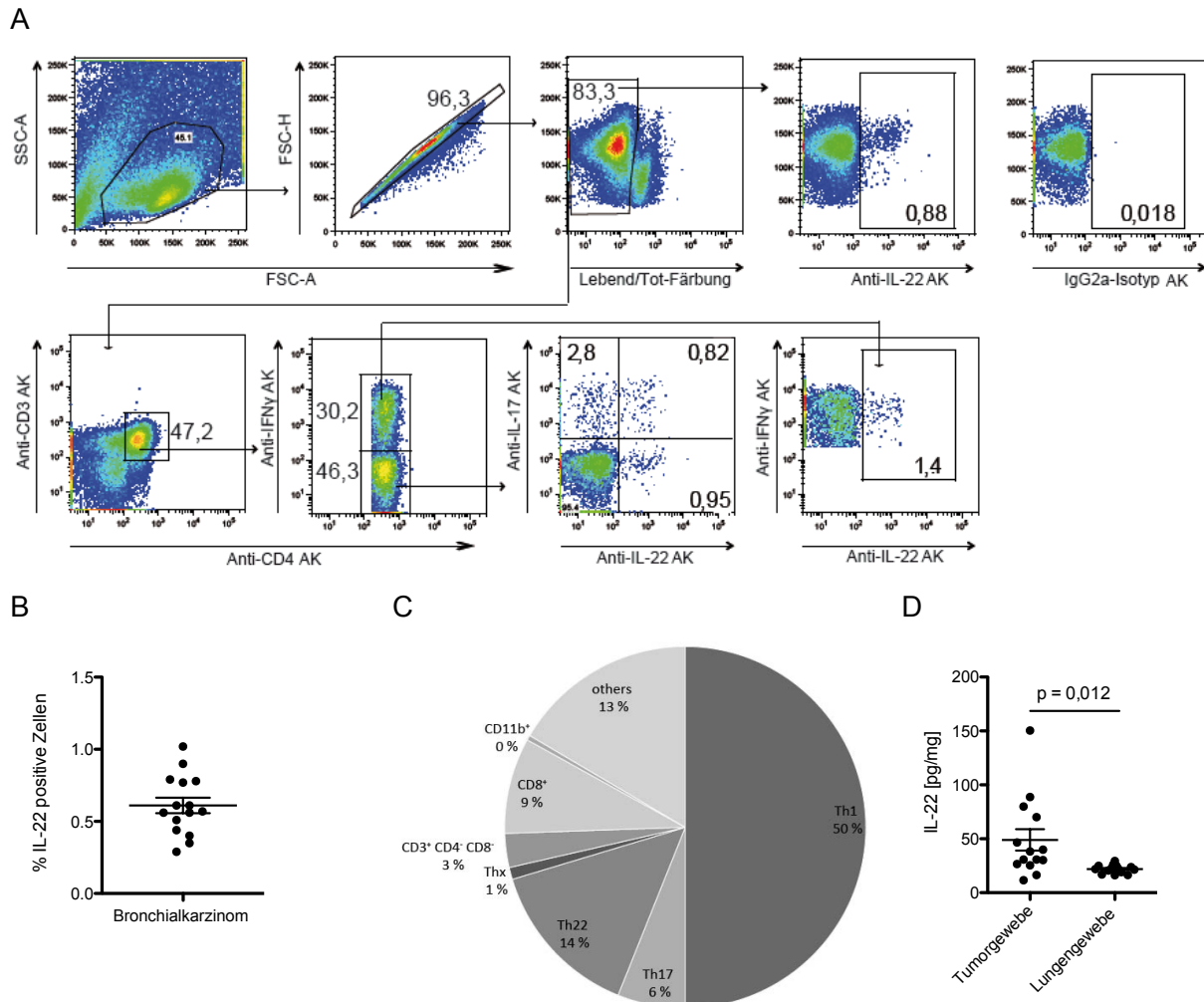
## **4.6 T-Helfer Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-22 in primärem Lungentumorgewebe**

### **4.6.1 Identifikation der IL-22-exprimierenden Zellen im Tumor von Patienten mit Bronchialkarzinom**

Um die Ergebnisse weiter zu validieren und deren Relevanz für die studierte Erkrankung des Lungenkarzinoms zu belegen, wurden primäre Lungenkarzinomproben auf das Vorhandensein von IL-22-produzierenden Zellen untersucht. Die T-Helfer Zellen wurden über deren CD3 und CD4 Expression ermittelt und weiterhin die verschiedenen IL-22-produzierenden Subpopulationen Th1 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$ ), Th17 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^-IL-17^+$ ) und Th22 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^-IL-17^-$ ) definiert (Abbildung 28 A).

Im Mittel konnten 0,61 % IL-22 positive Lymphozyten über die Durchflusszytometrie identifiziert werden (Abbildung 28 B). Hier fanden sich hauptsächlich T-Helferzellen als Quelle der IL-22-Produktion, darunter 50 % Th1, 14 % Th22 und 6 % Th17 Zellen. Des Weiteren produzierten 9 % der  $CD3^+CD8^+$  und 3 % der  $CD3^+CD4^-CD8^-$  Zellen IL-22. Es konnten keine  $CD11b^+IL-22^+$  Zellen nachgewiesen werden. 13 % der IL-22 sezernierenden Zellen konnten nicht über die vorhandenen Marker identifiziert werden (Abbildung 28 C).

In Gewebelysaten konnten höhere Mengen an IL-22 im Tumorgewebe verglichen mit entsprechendem Lungengewebe identifiziert werden. Im Mittel wurden 49 pg/mg IL-22 in den Tumorsysaten und 21,9 pg/mg im Lungengewebe gemessen (Abbildung 28 D).



**Abbildung 28: Identifikation der IL-22-produzierenden Zellen im Tumorgewebe von Patienten mit Bronchialkarzinom.** Einzelzellsuspensionen der Bronchialkarzinomproben wurden mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und intrazellulär mit IL-22 gefärbt. Anschließend folgte die Analyse der IL-22-Expression mittels Durchflusszytometrie von  $CD8^+$  T-Zellen, Th1 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$ ), Th17 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^-IL-17^+$ ), Th22 ( $CD3^+CD4^+IFN\gamma^-IL-17^-$ ), Thx ( $CD4^+Th1^-Th17^-Th22^-$ )  $CD3^+CD4^-CD8^-$  und  $CD11b^+$  Zellen. Tote Zellen konnten über einen Lebend-Tot-Farbstoff ausgeschlossen werden (A bis C). (D) Quantifizierung der IL-22-Sekretion von Tumor- und Lungenlysaten mittels ELISA (B bis C repräsentieren  $n = 15$  und D  $n = 14$  Patientenproben). Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

## 5 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit zeigt einen detaillierten Mechanismus über den Tumorzellen in Maus und Mensch die IL-22-Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren können. In diesem Modell ist die IL-22-Produktion von der Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren AhR und ROR $\gamma$ t in T-Zellen abhängig. Im murinen System wird IL-1 $\alpha$  von Lungen- und Brusttumorzellen ausgeschüttet und führt direkt zu einer Induktion von IL-22 aus T-Zellen. Humane Tumorzellen produzieren lösliche Faktoren, welche die IL-1 $\beta$ -Expression fördern, und somit eine IL-22-Produktion aus einer gemischten T-Helfer-Zell-Population hervorrufen. Noch keine Studie konnte einen Mechanismus zeigen wie IL-22 in der Tumorumgebung induziert wird. Diese Arbeit schlägt ein zum Teil konserviertes Modell für die IL-22-Produktion zwischen verschiedenen Tumorentitäten vor.

### 5.1 Die IL-22-Produktion von murinen Splenozyten wird über IL-1 $\alpha$ und IL-23 induziert

Diese Arbeit und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen, dass die IL-22-Produktion von murinen Splenozyten über IL-1 $\alpha$  und teilweise über IL-23 induziert werden kann. Beide Zytokine wurden in der Literatur als treibende Faktoren für die IL-22-Produktion beschrieben (Pennino *et al.*, 2013, Rutz *et al.*, 2013, Hernandez *et al.*, 2015).

IL-1 $\alpha$  konnte in Überständen und Proteinlysaten der murinen Tumorzelllinien identifiziert werden. Nach Stimulation der Tumorüberstände mit Splenozyten konnte eine gesteigerte IL-1 $\alpha$  Expression im Überstand nachgewiesen werden. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind zwei Zytokine mit geteilter Signalweiterleitung über den IL-1R, aber unterschiedlicher Biologie (Rider *et al.*, 2011). IL-1 $\alpha$  tritt hauptsächlich als intrazelluläre und membran-gebundene Form auf (Orjalo *et al.*, 2009, Gross *et al.*, 2012). Der IL-1 $\alpha$ -Precursor (Pro-IL-1 $\alpha$ ) wird über die Kalzium abhängige Protease Calpain in seine reife Form und das sogenannte IL-1 $\alpha$  N-terminale Peptid (IL-1NTP) gespalten (Voronov *et al.*, 2013). Des Weiteren wird IL-1 $\alpha$  von vielen verschiedenen Tumorentitäten exprimiert und fördert unter anderem die Inflammation. IL-1 $\alpha$  nimmt damit eine wichtige Rolle in der Tumorprogression ein (Apte *et al.*, 2006). Durch Zellstress wie beispielsweise Hypoxie, welche häufig in längerer Zellkultur und in wachsenden Tumoren auftritt, wird die Pro-IL-1 $\alpha$ -Expression stark erhöht. Durch nekrotischen Tumorzell-tod kann Pro-IL-1 $\alpha$  somit *in vitro* in der Zellkultur und *in vivo* im Tumor freigesetzt werden (Cooper and Beasley 1999, Rider *et al.*, 2011, Di Mitri *et al.*, 2014). Dies wäre ein möglicher Mechanismus, um das Vorhandensein von IL-1 $\alpha$  im Tumorzellüberstand der murinen Zelllinien zu erklären. IL-1 $\alpha$  kann weiterhin seine eigene

Freisetzung von Immunzellen fördern und so seinen Effekt auf IL-1R<sup>+</sup> Zellen verstärken. Somit wäre die erhöhte Menge an IL-1 $\alpha$  im Überstand nach Stimulation der Splenozyten mit Tumorzellüberstand erklärbar (Ghezzi and Dinarello 1988). Des Weiteren können über eine IL-1 $\alpha$ -Stimulation murine NCR<sup>+</sup> ILC3 Zellen IL-22 sezernieren (Hernandez *et al.*, 2015). Nach einer Stimulation der Splenozyten mittels IL-1 $\alpha$  war eine starke IL-22-Sekretion im Überstand messbar. Da IL-1 $\beta$  eine IL-22-Ausschüttung in verschiedenen Immunzellpopulationen hervorrufen kann ist davon auszugehen, dass diese Funktion von IL-1 $\beta$  auch auf IL-1 $\alpha$  extrapoliert werden kann (Zheng *et al.*, 2007, Goto *et al.*, 2009, Sutton *et al.*, 2009). Aus unseren Ergebnissen resultiert, dass IL-1 $\alpha$  im murinen Modell eine zentrale Rolle in der IL-22-Expression aus Immunzellen im Tumor einnimmt.

Weiterhin konnte IL-22 in einem geringeren Maß von IL-23 induziert werden. Wie IL-1 $\alpha$  kann IL-23 von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert werden (Gutcher and Becher 2007, Liu *et al.*, 2014). Im Hepatozellulären und Kolorektalen Karzinom konnten hohe IL-23-Level nachgewiesen werden, welche zusammen mit TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  vermutlich zu einer Th17-Polarisation führen und so die IL-22-Expression im Tumorgewebe induzieren (Jiang *et al.*, 2011, Jiang *et al.*, 2013a). IL-23 ist ein bekanntes Zytokin, welches in verschiedenen Immunzellpopulationen IL-22 induzieren kann und die T-Zell-Polarisation fördert (siehe Tabelle 1). Nach Stimulation mit Splenozyten konnte nur eine geringe Menge an IL-23 detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass IL-23 ausschließlich vom Tumorgewebe, nicht aber von den stimulierten Splenozyten ausgeschüttet wird. Somit ist seine Rolle vor allem auf die anfängliche IL-22-Expression beschränkt.

## **5.2 Die IL-22-Produktion von PBMCs wird über lösliche Faktoren von humanen Brust- und Lungentumorzellen induziert**

Im Kontrast zu den oben beschriebenen Ergebnissen scheint hauptsächlich IL-1 $\beta$  die Sekretion von IL-22 aus PBMCs zu induzieren. Im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  muss IL-1 $\beta$  von einer Cystein-Protease (Caspase-1), welche über das NALP3-Inflammasom im Zytosol aktiviert wird, geschnitten und somit aktiviert werden. Anschließend kann es im Fall einer Inflammation aktiv von den Zellen sezerniert werden (Voronov *et al.*, 2013, Guo *et al.*, 2015). IL-1 $\beta$  kann von verschiedenen Tumorzelllinien ausgeschüttet werden, allerdings konnten wir kein oder nur sehr wenig IL-1 $\beta$  in Proteinlysaten der humanen Tumorzelllinien detektieren (Elaraj *et al.*, 2006). Myeloide Zellen können IL-1 $\beta$  in der Tumorumgebung sezernieren und so den malignen Phänotyp fördern (Carmi *et al.*, 2009). In der Literatur ist beschrieben, dass sterbende Tumorzellen unter anderem Harnsäure ausschütten, ein Mechanismus welcher *Tumor Lysis Syndrom* genannt wird. Die Harnsäure könnte das NALP3-Inflammasom von

myeloiden Zellen aktivieren, was zu einer IL-1 $\beta$  Ausschüttung führt (Jeha 2001, Hu *et al.*, 2004, Kolb *et al.*, 2014). Daher können wir vermuten, dass IL-1 $\beta$  von myeloiden Zellen ausgeschüttet wird und somit die IL-22-Sekretion aus T-Zellen induziert. Es könnten auch andere lösliche Faktoren des Tumors, wie beispielsweise freie DNA oder RNA, welche TLR Rezeptoren aktivieren, die IL-1 $\beta$  Produktion von myeloiden Zellen fördern (Kaczmarek *et al.*, 2013). Eine endgültige Klärung bleibt zunächst noch offen.

### **5.3 Tumorzellen induzieren IL-22-Sekretion aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Quelle von IL-22 in verschiedenen Tumorarten wird derzeit diskutiert und variiert vermutlich zwischen den Entitäten und der analysierten Spezies (Sonnenberg *et al.*, 2011a, Lim and Savan 2014). In dieser Arbeit sind IFN $\gamma$  und IL-17 sezernierende T-Zellen die Hauptproduzenten von IL-22 nach Stimulation mit Tumorüberstand oder IL-1 $\alpha$  in der Maus.

In der Literatur ist auch beschrieben, dass T-Zellen die Hauptproduzenten von IL-22 sind (Dudakov 2015). Bisher konnte ausschließlich für murine NCR<sup>-</sup> ILC3 gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  die IL-22-Sekretion induzieren kann (Hernandez 2015). Murine NCR<sup>-</sup> ILC3 sezernieren auch IL-17 und eine geringe Menge an IFN $\gamma$ , allerdings sind alle ILC3 CD3 negativ. Des Weiteren sind sie hauptsächlich in der Mukosa lokalisiert (Walker *et al.*, 2013, Killig *et al.*, 2014). Daher ist davon auszugehen, dass es sich in dieser Arbeit um T-Zellen handelt, welche IL-22, IL-17 und IFN $\gamma$  exprimieren. Dies würde für Th1, Th17 und Th22 Zellen sprechen.

Im Menschen konnten ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestehend aus Th1, Th17 und Th22 Zellen IL-22 sezernieren. Nach Antagonisierung von IL-1 konnten im humanen Modell keine IFN $\gamma$  und IL-17 sezernierende T-Zellen nachgewiesen werden.

Da IL-1 $\beta$  durch beispielsweise Harnsäure von myeloiden Zellen ausgeschüttet werden kann, können wir vermuten, dass IL-1 $\beta$  die T-Helfer-Zell Polarisation fördert. Dieser Mechanismus der T-Zell-Polarisation wurde für DCs beschrieben (Zou *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass IL-1 für die Polarisation der Immunzellen zu verschiedenen T-Helfer-Zell-Populationen verantwortlich ist und somit die IL-22-Expression aus diesen Zellen fördert. Wiederum können humane ILC3 als IL-22-Produzenten ausgeschlossen werden, da sie kein CD3 exprimieren (Walker *et al.*, 2013, Killig *et al.*, 2014).



#### **5.4 Die Transkriptionsfaktoren AhR und RORyt sind für die Tumorzell-induzierte IL-22-Produktion verantwortlich**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren RORyt als auch AhR benötigt werden, um die IL-22-Produktion zu gewährleisten. Wird einer der beiden Transkriptionsfaktoren inhibiert ist im murinen Modell keine oder nur eine sehr geringe IL-22-Expression vorhanden.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Polarisation von murinen Th17, Th22, ILC3 und LTi Zellen von RORyt und im Fall von murinen Th22, NCR<sup>+</sup> ILC3 und LTi Zellen auch von AhR abhängig ist (Ivanov *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2008b, Crellin *et al.*, 2010, Qiu *et al.*, 2012, Glatzer *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2013, Yeste *et al.*, 2014). Des Weiteren benötigen Th17, Th22,  $\gamma\delta$  T-Zellen, ILC3 und LTi Zellen den Transkriptionsfaktor AhR für die IL-22-Produktion (Veldhoen *et al.*, 2008, Martin *et al.*, 2009, Trifari *et al.*, 2009, Alam *et al.*, 2010, Kiss *et al.*, 2011, Basu *et al.*, 2012, Qiu *et al.*, 2012). Da IL-17 und IFN $\gamma$  produzierende CD3<sup>+</sup> T-Zellen im murinen Modell die Hauptproduzenten von IL-22 sind, können ILC3 und LTi Zellen ausgeschlossen werden, da diese kein CD3 exprimieren (Walker *et al.*, 2013, Killig *et al.*, 2014). Des Weiteren konnten keine IL-22 positiven  $\gamma\delta$  T-Zellen in 4T1 oder Line-1 Tumoren identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Wird RORyt antagonisiert könnte somit die Polarisation und die Erhaltung der Th17 und Th22 Zellen gestört sein. Wird der AhR blockiert kann trotz der vorhandenen Th17 und Th22 Zellen keine IL-22-Sekretion der Zellen stattfinden (Ivanov *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2008a, Yeste *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte in RORyt<sup>+</sup> ILCs eine Abhängigkeit der IL-22-Expression von RORyt und AhR bestätigt werden, da die Bindung dieser an den IL-22 Locus zu einer stärkeren IL-22-Sekretion führte, als die Bindung jedes einzelnen Transkriptionsfaktors (Qiu *et al.*, 2012). Vor allem im murinen Modell konnte die Antagonisierung einer der beiden Transkriptionsfaktoren zu einer signifikanten Reduktion von IL-22 führen, was die oben genannten Beobachtungen in RORyt<sup>+</sup> ILCs bestätigen könnte. Möglicherweise ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den IL-22 Locus in T-Zellen ähnlich reguliert. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass die Antagonisierung des AhR mit einem kommerziell zugänglichen Antagonisten die IL-22-Produktion in tumortragenden Mäusen blockieren konnte. Dies belegt die *in vitro* Ergebnisse und zeigt, dass der AhR essentiell für die IL-22-Sekretion aus T-Zellen ist.

Im humanen Modell konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Die IL-22-Sekretion wurde durch die Stimulation mit H1339, CAMA-1 und MDAMB231 mittels RORyt Antagonisierung signifikant reduziert. Des Weiteren konnte die IL-22-Produktion nach Stimulation mit A549 und MDAMB231 durch Inhibition des AhR signifikant verringert werden.

Ähnlich wie im murinen Modell ist in der Literatur beschrieben, dass der AhR für die IL-22-Sekretion von Th17, Th22, NKT und NK-Zellen notwendig ist (Veldhoen *et al.*, 2008, Trifari *et al.*, 2009, Hughes *et al.*, 2010, Kiss *et al.*, 2011, Moreira-Teixeira *et al.*, 2011, Basu *et al.*, 2012, Qiu *et al.*, 2012). ROR $\gamma$ t wurde bisher für die Erhaltung und Differenzierung von Th17, NCR<sup>+</sup>ILC3 und LT $\alpha$ i Zellen beschrieben (Manel *et al.*, 2008, Crellin *et al.*, 2010, Crome *et al.*, 2010, Glatzer *et al.*, 2013). Wie zuvor dargestellt können die NCR<sup>+</sup>ILC3 und LT $\alpha$ i Zellen als IL-22-Produzenten in unserem Modell ausgeschlossen werden. Daher könnte die Differenzierung der Th17 Zellen über eine ROR $\gamma$ t Antagonisierung blockiert und somit die IL-22-Sekretion reduzieren werden. Damit wären ausschließlich Th17 Zellen für die IL-22-Sekretion nach Stimulationen mit humanem Tumorzellüberstand verantwortlich. Allerdings konnte noch kein Transkriptionsfaktor für die Differenzierung der humanen Th22 Zellen beschrieben werden. Daher wäre es möglich, dass wie im murinen Modell beschrieben ROR $\gamma$ t für die Th22 Differenzierung notwendig ist. Des Weiteren scheint der AhR nicht alleine für die IL-22-Sekretion aus PBMCs verantwortlich zu sein, da nach dessen Inhibition nicht in allen Stimulationen die IL-22-Produktion reduziert war.

Darüber hinaus scheinen Th1 Zellen die Hauptproduzenten von IL-22 im Tumor zu sein. Derzeit ist kein Transkriptionsfaktor bekannt, welcher die IL-22-Expression in dieser Zellpopulation direkt fördern kann. In einigen Artikeln konnten AhR Agonisten zu einer hohen IFN $\gamma$  Sekretion und sogar zu einer Th1-Polarisation führen (Negishi *et al.*, 2005, Ito *et al.*, 2008, Benson and Shepherd 2011). Da AhR, ROR $\gamma$ t oder hauptsächlich beide Transkriptionsfaktoren für die IL-22-Expression nötig sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese Transkriptionsfaktoren nicht nur für die IL-22-Produktion in Th17, Th22 und ILC Zellen, sondern auch in Th1 Zellen wichtig sind.

## **5.5 T-Helfer-Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-22 in primärem Lungentumorgewebe**

In dieser Arbeit sind hauptsächlich Th1 Zellen (50 %) die IL-22-Produzenten in primärem Lungentumorgewebe, gefolgt von Th22 und Th17 Zellen. Ungefähr 25 % der IL-22-produzierenden Zellen konnten weder T-Zellen, noch CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen zugeordnet werden.

In verschiedenen Tumorentitäten waren erhöhte Level von IL-22-produzierenden Immunzellen im Tumor und Blut von Patienten messbar. In Magen-, Pankreas-, Leber- und Kolonkarzinom wurde IL-22 hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert (Liu *et al.*, 2012, Zhuang *et al.*, 2012, Jiang *et al.*, 2013a, Qin *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2014). In einigen Studien

konnte gezeigt werden, dass vor allem Th1 und Th17 Zellen in Patienten mit Lungentumoren vorhanden sind, wobei die IL-22-Sekretion dieser Immunzellpopulationen nicht untersucht wurde (Koyama *et al.*, 2008, Goc *et al.*, 2014). Des Weiteren konnten IL-22<sup>+</sup> ILCs in bakteriell induzierten Kolonkarzinomen in B- und T-Zell defizienten Mäusen und im Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom (NSCLC) nachgewiesen werden (Kirchberger *et al.*, 2013, Carrega *et al.*, 2015). Da ILCs CD3 negativ sind könnten diese einen Teil der nicht identifizierten IL-22-produzierenden Immunzellpopulation darstellen. Weiterhin könnte es sich um unreife NK-Zellen handeln, da diese im Kolonkarzinom als IL-22-produzierende Zellen identifiziert wurden (Jiang *et al.*, 2013a).

Weiterhin wird in dieser Arbeit nachgewiesen, dass im Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreiem Lungengewebe eine signifikant höhere IL-22-Expression besteht. Die Rolle von IL-22 in der Tumorentwicklung und Progression konnte in verschiedenen epithelialen Tumoren beschrieben werden (Gelebart *et al.*, 2011, Kobold *et al.*, 2013). Wenn Immunzellen IL-22 exprimieren, kann unter anderem das Wachstum, die Aggressivität, die Therapieresistenz der Tumorzellen und deren Metastasierung gefördert werden (Lim and Savan 2014, Shalapour and Karin 2015). Des Weiteren ist die Sekretion von IL-22 aus Tumor-infiltrierenden Immunzellen in einigen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose assoziiert. In gastrointestinalen Tumoren war die Infiltration in CD4<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup> T-Zellen in späteren Tumorstadien erhöht und konnte als negativer prognostischer Marker identifiziert werden (Zhuang *et al.*, 2012). In Patienten mit Kolorektalem Karzinom korrelierte die IL-17 und IL-22-Menge positiv mit dem *Staging* der Tumore (Petanidis *et al.*, 2013). Bei Patienten mit Hepatozellulärem-Tumor konnten hohe Level an IL-22 im Serum nachgewiesen werden, welche mit einer schlechten Prognose korrelierten (Waidmann *et al.*, 2013). Die erhöhte IL-22-Expression in den Lungentumoren könnte zu einem tumorfördernden Effekt führen und im Fall einer sehr hohen IL-22-Expression, wie bei einigen Patienten gezeigt, folglich auch eine schlechte Prognose darstellen.

## **5.6 Zusammenfassung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass murine Brust- und Lungentumorzellen über deren IL-1 $\alpha$ -Produktion eine IL-22-Sekretion aus T-Zellen fördern. Des Weiteren war die Polarisation von humanen T-Zellen zu einem gemischten T-Helfer-Phänotyp von IL-1 $\beta$  abhängig. Es konnte kein IL-1 $\beta$  im Überstand der humanen Tumorzelllinien detektiert werden. Daher können wir annehmen, dass lösliche Faktoren im humanen Tumorüberstand dazu führen, dass IL-1 $\beta$  über die Aktivierung des NALP3-Inflammasoms aus myeloide Zellen ausgeschüttet wird und so die Polarisation und

resultierende IL-22-Expression fördern. Um diese möglichen Faktoren im Tumorüberstand identifizieren zu können, sollten diese auf Harnsäure, freie RNA oder DNA untersucht werden.

Bei Patienten mit Bronchialkarzinom konnte eine signifikant höhere IL-22-Menge im Tumorgewebe, verglichen mit entsprechendem Lungengewebe, identifiziert werden. In wie fern das erhöhte IL-22-Level mit einer schlechteren Prognose der Patienten zusammenhängt soll in der fortlaufenden Studie analysiert werden. Da IL-22 in unterschiedlichen Klinischen Studien hauptsächlich positive Korrelationen mit Tumorrisiko und Tumorprogression in verschiedenen Geweben zeigt, könnte die Blockade des IL-22-Signalwegs ein neuer Ansatz zur anti-tumoralen-Therapie darstellen. Anti-IL-22 neutralisierende Antikörper gegen Psoriasis und Rheumatoider Arthritis befinden sich derzeit in klinischen Studien der Phase I und II. Diese Antikörper könnten somit auch zur Tumorthherapie getestet werden. Einige zugelassene Antikörper beispielsweise gegen TNF $\alpha$  und IL-12p40 beeinflussen die IL-22-Expression, sind aber mit starken Nebenwirkungen verbunden (Lim and Savan 2014). Die direkte Blockade des IL-22-R1 könnte eine attraktive Zielstruktur darstellen, da dieser ausschließlich auf Epithelzellen exprimiert wird und somit nicht das gesamte Immunsystem beeinflussen kann.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit einen zuvor unbekannten Mechanismus in dem Tumorzellen IL-22 direkt von T-Zellen induzieren können und schlägt die Brücke zwischen der in der Literatur beschriebenen IL-22-Expression und Funktion in Tumorgewebe, sowie seine Herkunft. Diese Arbeit könnte die Basis für zukünftige therapeutische Maßnahmen gegen die IL-22-Achse darstellen und leistet einen Beitrag zu unserem Wissen über die Interaktion des Immunsystems mit der Tumorbilogie.

## 6 Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., M. H. Xie, M. Maruoka, J. Foster and A. L. Gurney (2001). Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22.

*Journal of interferon & cytokine research* 21(12):1047-1053.

Alam, M. S., Y. Maekawa, A. Kitamura, K. Tanigaki, T. Yoshimoto, K. Kishihara and K. Yasutomo (2010). Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4<sup>+</sup> T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(13):5943-5948.

Andoh, A., Z. Zhang, O. Inatomi, S. Fujino, Y. Deguchi, Y. Araki, T. Tsujikawa, K. Kitoh, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu and Y. Fujiyama (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts.

*Gastroenterology* 129(3):969-984.

Apte, R. N., S. Dotan, M. Elkabets, M. R. White, E. Reich, Y. Carmi, X. Song, T. Dvozkin, Y. Krelin and E. Voronov (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions.

*Cancer metastasis reviews* 25(3):387-408.

Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, J. M. Pilewski, M. M. Myerburg, C. A. Mason, Y. Iwakura and J. K. Kolls (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.

*Nature Medicine* 14(3):275-281.

Bard, J. D., P. Gelebart, M. Anand, H. M. Amin and R. Lai (2008). Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK<sup>+</sup> anaplastic large cell lymphoma.

*Leukemia* 22(8):1595-1603.

Basu, R., D. B. O'Quinn, D. J. Silberberger, T. R. Schoeb, L. Fouser, W. Ouyang, R. D. Hatton and C. T. Weaver (2012). Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria.

*Immunity* 37(6):1061-1075.

Behrends, J., J. C. Renauld, S. Ehlers and C. Holscher (2013). IL-22 is mainly produced by IFN $\gamma$ -secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection.

*PloS one* 8(2):e57379.

Benson, J. M. and D. M. Shepherd (2011). Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease.

*Toxicological Sciences* 120(1):68-78.

Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron and F. Morel (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes.

*Journal of Immunology* 174(6):3695-3702.

Boniface, K., E. Guignouard, N. Pedretti, M. Garcia, A. Delwail, F. X. Bernard, F. Nau, G. Guillet, G. Dagregorio, H. Yssel, J. C. Lecron and F. Morel (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation.

*Clinical and experimental Immunology* 150(3):407-415.

Brand, S., F. Beigel, T. Olszak, K. Zitzmann, S. T. Eichhorst, J. M. Otte, H. Diepolder, A. Marquardt, W. Jagla, A. Popp, S. Leclair, K. Herrmann, J. Seiderer, T. Ochsenkuhn, B. Goke, C. J. Auernhammer and J. Dambacher (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration.

*American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290(4):G827-838.

Brand, S., J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann, M. H. Heeg, T. S. Weiss, T. Prufer, T. Olszak, C. J. Steib, M. Storr, B. Goke, H. Diepolder, M. Bilzer, W. E. Thasler and C. J. Auernhammer (2007). IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro.

*American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292(4):G1019-1028.

Carmi, Y., E. Voronov, S. Dotan, N. Lahat, M. A. Rahat, M. Fogel, M. Huszar, M. R. White, C. A. Dinarello and R. N. Apte (2009). The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis.

*Journal of Immunology* 183(7):4705-4714.

Carrega, P., F. Loiacono, E. Di Carlo, A. Scaramuccia, M. Mora, R. Conte, R. Benelli, G. M. Spaggiari, C. Cantoni, S. Campana, I. Bonaccorsi, B. Morandi, M. Truini, M. C. Mingari, L.

- Moretta and G. Ferlazzo (2015). NCR(+)ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures.  
*Nature Communications* 6:8280.
- Cella, M., K. Otero and M. Colonna (2010). Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(24):10961-10966.
- Ciric, B., M. El-behi, R. Cabrera, G. X. Zhang and A. Rostami (2009). IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells.  
*Journal of Immunology* 182(9):5296-5305.
- Cooper, A. L. and D. Beasley (1999). Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1alpha production in human vascular smooth muscle cells.  
*The American Journal of Physiology* 277(4 Pt 2):H1326-1337.
- Crellin, N. K., S. Trifari, C. D. Kaplan, T. Cupedo and H. Spits (2010). Human NKp44+IL-22+ cells and LTi-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells.  
*Journal of Experimental Medicine* 207(2):281-290.
- Crome, S. Q., A. Y. Wang and M. K. Levings (2010). Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease.  
*Clinical and Experimental Immunology* 159(2):109-119.
- Curd, L. M., S. E. Favors and R. K. Gregg (2012). Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells.  
*Clinical and Experimental Immunology* 168(2):192-199.
- da Rocha, L. F., Jr., A. L. Duarte, A. T. Dantas, H. A. Mariz, R. Pitta Ida, S. L. Galdino and M. G. Pitta (2012). Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity.  
*The Journal of Rheumatology* 39(7):1320-1325.
- Dhiman, R., M. Indramohan, P. F. Barnes, R. C. Nayak, P. Paidipally, L. V. Rao and R. Vankayalapati (2009). IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion.  
*Journal of Immunology* 183(10):6639-6645.
- Di Mitri, D., A. Toso, J. J. Chen, M. Sarti, S. Pinton, T. R. Jost, R. D'Antuono, E. Montani, R. Garcia-Escudero, I. Guccini, S. Da Silva-Alvarez, M. Collado, M. Eisenberger, Z. Zhang, C.

- Catapano, F. Grassi and A. Alimonti (2014). Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer.  
*Nature* 515(7525):134-137.
- Doisne, J. M., V. Soulard, C. Becourt, L. Amniai, P. Henrot, C. Havenar-Daughton, C. Blanchet, L. Zitvogel, B. Ryffel, J. M. Cavaillon, J. C. Marie, I. Couillin and K. Benlagha (2011). Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria.  
*Journal of Immunology* 186(2):662-666.
- Dudakov, J. A., A. M. Hanash, R. R. Jenq, L. F. Young, A. Ghosh, N. V. Singer, M. L. West, O. M. Smith, A. M. Holland, J. J. Tsai, R. L. Boyd and M. R. van den Brink (2012). Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice.  
*Science* 336(6077):91-95.
- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells.  
*Nature Immunology* 10(8):857-863.
- Dumoutier, L., D. Lejeune, D. Colau and J. C. Renauld (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22.  
*Journal of Immunology* 166(12):7090-7095.
- Dumoutier, L., J. Louahed and J. C. Renauld (2000). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9.  
*Journal of Immunology* 164(4):1814-1819.
- Elaraj, D. M., D. M. Weinreich, S. Varghese, M. Puhlmann, S. M. Hewitt, N. M. Carroll, E. D. Feldman, E. M. Turner and H. R. Alexander (2006). The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts.  
*Clinical Cancer Research* 12(4):1088-1096.
- Eysteinsdottir, J. H., B. Sigurgeirsson, J. H. Olafsson, T. Fridriksson, B. A. Agnarsson, S. Daviethsson, H. Valdimarsson and B. R. Luethviksson (2013). The role of Th17/Tc17 peripheral blood T cells in psoriasis and their positive therapeutic response.  
*Scandinavian Journal of Immunology* 78(6):529-537.



Fujita, H., K. E. Nogales, T. Kikuchi, J. Gonzalez, J. A. Carucci and J. G. Krueger (2009). Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cells lacking IL-17 production.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(51):21795-21800.

Fukui, H., X. Zhang, C. Sun, K. Hara, S. Kikuchi, T. Yamasaki, T. Kondo, T. Tomita, T. Oshima, J. Watari, J. Imura, T. Fujimori, M. Sasako and H. Miwa (2014). IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling.

*British Journal of Cancer* 111(4):763-771.

Geboes, L., L. Dumoutier, H. Kelchtermans, E. Schurgers, T. Mitera, J. C. Renauld and P. Matthys (2009). Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice.

*Arthritis and Rheumatism* 60(2):390-395.

Gelebart, P., Z. Zak, J. Dien-Bard, M. Anand and R. Lai (2011). Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma.

*Translational Oncology* 4(1):9-19.

Ghezzi, P. and C. A. Dinarello (1988). IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN-gamma.

*Journal of Immunology* 140(12):4238-4244.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467(7318):967-971.

Glatzer, T., M. Killig, J. Meisig, I. Ommert, M. Luetke-Eversloh, M. Babic, D. Paclik, N. Bluthgen, R. Seidl, C. Seifarth, J. Grone, M. Lenarz, K. Stolzel, D. Fugmann, A. Porgador, A. Hauser, A. Karlas and C. Romagnani (2013). RORgammat(+) innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44.

*Immunity* 38(6):1223-1235.

Goc, J., C. Germain, T. K. Vo-Bourgais, A. Lupo, C. Klein, S. Knockaert, L. de Chaisemartin, H. Ouakrim, E. Becht, M. Alifano, P. Validire, R. Remark, S. A. Hammond, I. Cremer, D. Damotte, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman and M. C. Dieu-Nosjean (2014). Dendritic cells

in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells.

*Cancer Research* 74(3):705-715.

Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten and S. L. Reiner (2012). The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation.

*Immunity* 36(1):55-67.

Goto, M., M. Murakawa, K. Kadoshima-Yamaoka, Y. Tanaka, K. Nagahira, Y. Fukuda and T. Nishimura (2009). Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22.

*Cellular Immunology* 254(2):81-84.

Gross, O., A. S. Yazdi, C. J. Thomas, M. Masin, L. X. Heinz, G. Guarda, M. Quadroni, S. K. Drexler and J. Tschopp (2012). Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1.

*Immunity* 36(3):388-400.

Guo, H., J. B. Callaway and J. P. Ting (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics.

*Nature Medicine* 21(7):677-687.

Guo, H. and D. J. Topham (2010). Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection.

*Journal of Virology* 84(15):7750-7759.

Gurney, A. L. (2004). IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues.

*International Immunopharmacology* 4(5):669-677.

Gutcher, I. and B. Becher (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation.

*The Journal of Clinical Investigation* 117(5):1119-1127.

Hansson, M., E. Silverpil, A. Linden and P. Glader (2013). Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response.

*Inflammation Research* 62(6):561-569.

Hayes, M. D., V. Ovcinnikovs, A. G. Smith, I. Kimber and R. J. Dearman (2014). The aryl hydrocarbon receptor: differential contribution to T helper 17 and T cytotoxic 17 cell development.

*PloS one* 9(9):e106955.

Hernandez, P. P., T. Mahlakoiv, I. Yang, V. Schwierzeck, N. Nguyen, F. Guendel, K. Gronke, B. Ryffel, C. Holscher, L. Dumoutier, J. C. Renauld, S. Suerbaum, P. Staeheli and A. Diefenbach (2015). Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection.  
*Nature Immunology* 16(7):698-707.

Hu, D. E., A. M. Moore, L. L. Thomsen and K. M. Brindle (2004). Uric acid promotes tumor immune rejection.  
*Cancer Research* 64(15):5059-5062.

Huang, Y. H., Y. F. Cao, Z. Y. Jiang, S. Zhang and F. Gao (2015). Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development.  
*World Journal of Gastroenterology* 21(14):4216-4224.

Huber, S., N. Gagliani, L. A. Zenewicz, F. J. Huber, L. Bosurgi, B. Hu, M. Hedl, W. Zhang, W. O'Connor, Jr., A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, C. J. Booth, J. H. Cho, W. Ouyang, C. Abraham and R. A. Flavell (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine.  
*Nature* 491(7423):259-263.

Hughes, T., B. Becknell, A. G. Freud, S. McClory, E. Briercheck, J. Yu, C. Mao, C. Giovenzana, G. Nuovo, L. Wei, X. Zhang, M. A. Gavrillin, M. D. Wewers and M. A. Caligiuri (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue.  
*Immunity* 32(6):803-814.

Ikeda, S., S. Saijo, M. A. Murayama, K. Shimizu, A. Akitsu and Y. Iwakura (2014). Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression.  
*Journal of Immunology* 192(4):1449-1458.

Ikeuchi, H., T. Kuroiwa, N. Hiramatsu, Y. Kaneko, K. Hiromura, K. Ueki and Y. Nojima (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine.  
*Arthritis and Rheumatism* 52(4):1037-1046.

Ito, M., K. Teshima, S. Ikeda, A. Kitadate, A. Watanabe, M. Nara, J. Yamashita, K. Ohshima, K. Sawada and H. Tagawa (2014). MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6 in advanced cutaneous T-cell lymphoma.

*Blood* 123(10):1499-511.

Ito, T., K. Inouye, K. Nohara, C. Tohyama and H. Fujimaki (2008). TCDD exposure exacerbates atopic dermatitis-related inflammation in NC/Nga mice.

*Toxicology letters* 177(1):31-37.

Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.

*Cell* 126(6):1121-1133.

Jeha, S. (2001). Tumor lysis syndrome.

*Seminars in Hematology* 38(4 Suppl 10):4-8.

Jiang, R., Z. Tan, L. Deng, Y. Chen, Y. Xia, Y. Gao, X. Wang and B. Sun (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3.

*Hepatology* 54(3):900-909.

Jiang, R., H. Wang, L. Deng, J. Hou, R. Shi, M. Yao, Y. Gao, A. Yao, X. Wang, L. Yu and B. Sun (2013a). IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3.

*BMC Cancer* 13:59.

Jiang, R., C. Zhang, Y. Xia, X. Qian, X. Wang and B. Sun (2013b). Serum interleukin-22 level is a negative prognostic indicator in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma.

*Hepatology* 59(3):1208

Jones, B. C., N. J. Logsdon and M. R. Walter (2008). Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain.

*Structure* 16(9):1333-1344.

Kaczmarek, A., P. Vandenabeele and D. V. Krysko (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance.

*Immunity* 38(2):209-223.

Killig, M., T. Glatzer and C. Romagnani (2014). Recognition strategies of group 3 innate lymphoid cells.

*Frontiers in Immunology* 5:142.

- Kim, K., G. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yun, S. C. Lim and H. S. Choi (2014). Interleukin-22 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via MAP3K8 activation. *Carcinogenesis* 35(6):1352-1361.
- Kirchberger, S., D. J. Royston, O. Boulard, E. Thornton, F. Franchini, R. L. Szabady, O. Harrison and F. Powrie (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *Journal of Experimental Medicine* 210(5):917-31
- Kiss, E. A., C. Vonarbourg, S. Kopfmann, E. Hobeika, D. Finke, C. Esser and A. Diefenbach (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* 334(6062):1561-1565.
- Kobold, S., S. Volk, T. Clauditz, N. J. Kupper, S. Minner, A. Tufman, P. Duwell, M. Lindner, I. Koch, S. Heidegger, S. Rothenfuer, M. Schnurr, R. M. Huber, W. Wilczak and S. Endres (2013). Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells. *Journal of Thoracic Oncology* 8(8):1032-1042.
- Kolb, R., G. H. Liu, A. M. Janowski, F. S. Sutterwala and W. Zhang (2014). Inflammasomes in cancer: a double-edged sword. *Protein & Cell* 5(1):12-20.
- Kotenko, S. V., L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R. P. Donnelly and S. Pestka (2001). Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *Journal of Immunology* 166(12):7096-7103.
- Koyama, K., H. Kagamu, S. Miura, T. Hiura, T. Miyabayashi, R. Itoh, H. Kuriyama, H. Tanaka, J. Tanaka, H. Yoshizawa, K. Nakata and F. Gejyo (2008). Reciprocal CD4<sup>+</sup> T-cell balance of effector CD62L<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> and CD62L<sup>high</sup>CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. *Clinical Cancer Research* 14(21):6770-6779.
- Kryczek, I., Y. Lin, N. Nagarsheth, D. Peng, L. Zhao, E. Zhao, L. Vatan, W. Szeliga, Y. Dou, S. Owens, W. Zgodzinski, M. Majewski, G. Wallner, J. Fang, E. Huang and W. Zou (2014). IL-22CD4<sup>+</sup> T cells promote colorectal cancer stemness via stat3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* 40(5):772-84

Kulkarni, O. P., I. Hartter, S. R. Mulay, J. Hagemann, M. N. Darisipudi, S. Kumar Vr, S. Romoli, D. Thomasova, M. Ryu, S. Kobold and H. J. Anders (2014). Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration.

*Journal of the American Society of Nephrology* 25(5):978-989.

Lee, Y., Y. Kumagai, M. S. Jang, J. H. Kim, B. G. Yang, E. J. Lee, Y. M. Kim, S. Akira and M. H. Jang (2013). Intestinal Lin-c-Kit+NKp46-CD4- Population Strongly Produces IL-22 upon IL-1beta Stimulation.

*Journal of Immunology* 190(10):5296-305

Leipe, J., M. A. Schramm, M. Grunke, M. Baeuerle, C. Dechant, A. P. Nigg, M. N. Witt, V. Vielhauer, C. S. Reindl, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2011). Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis.

*Annals of the Rheumatic Diseases* 70(8):1453-1457.

Lejeune, D., L. Dumoutier, S. Constantinescu, W. Kruijer, J. J. Schuringa and J. C. Renauld (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10.

*The Journal of Biological Chemistry* 277(37):33676-33682.

Liang, S. C., C. Nickerson-Nutter, D. D. Pittman, Y. Carrier, D. G. Goodwin, K. M. Shields, A. J. Lambert, S. H. Schelling, Q. G. Medley, H. L. Ma, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos and L. A. Fouser (2010). IL-22 induces an acute-phase response.

*Journal of Immunology* 185(9):5531-5538.

Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.

*Journal of Experimental Medicine* 203(10):2271-2279.

Lim, C. and R. Savan (2014). The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer.

*Cytokine & growth factor reviews* 25(3):257-271.

Liu, C., Y. Zhang, J. Zhan, Y. Zhao, Q. Wan, H. Peng and W. Zhu (2014). Interleukin-23A is associated with tumor growth in Helicobacter-pylori-related human gastric cancer.

*Cancer Cell International* 14(1):104.

Liu, T., L. Peng, P. Yu, Y. Zhao, Y. Shi, X. Mao, W. Chen, P. Cheng, T. Wang, N. Chen, J. Zhang, X. Liu, N. Li, G. Guo, W. Tong, Y. Zhuang and Q. Zou (2012). Increased circulating

Th22 and Th17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer.

*Journal of Clinical Immunology* 32(6):1332-1339.

Liu, Y., B. Yang, J. Ma, H. Wang, F. Huang, J. Zhang, H. Chen and C. Wu (2011).

Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription.

*Immunology* 132(4):540-548.

Logsdon, N. J., B. C. Jones, J. C. Allman, L. Izotova, B. Schwartz, S. Pestka and M. R.

Walter (2004). The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation.

*Journal of Molecular Biology* 342(2):503-514.

Logsdon, N. J., B. C. Jones, K. Josephson, J. Cook and M. R. Walter (2002). Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes.

*Journal of Interferon & Cytokine Research* 22(11):1099-1112.

Ma, H. L., S. Liang, J. Li, L. Napierata, T. Brown, S. Benoit, M. Senices, D. Gill, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, C. Nickerson-Nutter, L. A. Fouser and D. A. Young (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation.

*The Journal of Clinical Investigation* 118(2):597-607.

Manel, N., D. Unutmaz and D. R. Littman (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma.

*Nature Immunology* 9(6):641-649.

Martin, B., K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger and M. Veldhoen (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals.

*Immunity* 31(2):321-330.

McLean, M., H. L. Wallace, A. Sharma, H. C. Hill, M. S. Sabel and N. K. Egilmez (2004). A BALB/c murine lung alveolar carcinoma used to establish a surgical spontaneous metastasis model.

*Clinical & experimental metastasis* 21(4):363-369.

Miller, F. R., B. E. Miller and G. H. Heppner (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability.

*Invasion & metastasis* 3(1):22-31.

Mitra, A., S. K. Raychaudhuri and S. P. Raychaudhuri (2012). IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade.

*Cytokine* 60(1):38-42.

Miyagaki, T., M. Sugaya, H. Suga, M. Kamata, H. Ohmatsu, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono and S. Sato (2011). IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma.

*Clinical Cancer Research* 17(24):7529-7538.

Monteleone, I., A. Rizzo, M. Sarra, G. Sica, P. Sileri, L. Biancone, T. T. MacDonald, F. Pallone and G. Monteleone (2011). Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract.

*Gastroenterology* 141(1):237-248, 248 e231.

Moreira-Teixeira, L., M. Resende, M. Coffre, O. Devergne, J. P. Herbeuval, O. Hermine, E. Schneider, L. Rogge, F. M. Ruemmele, M. Dy, A. Cordeiro-da-Silva and M. C. Leite-de-Moraes (2011). Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells.

*Journal of Immunology* 186(10):5758-5765.

Nagakawa, H., O. Shimoza, L. Yu, Y. Takiguchi, K. Tatsumi, T. Kuriyama and M. Tagawa (2004). Expression of interleukin-22 in murine carcinoma cells did not influence tumour growth in vivo but did improve survival of the inoculated hosts.

*Scandinavian Journal of Immunology* 60(5):449-454.

Nagalakshmi, M. L., A. Rascole, S. Zurawski, S. Menon and R. de Waal Malefyt (2004). Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells.

*International Immunopharmacology* 4(5):679-691.

Naher, L., T. Kiyoshima, I. Kobayashi, H. Wada, K. Nagata, H. Fujiwara, Y. F. Ookuma, S. Ozeki, S. Nakamura and H. Sakai (2012). STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma.

*International Journal of Oncology* 41(5):1577-1586.



Nardinocchi, L., G. Sonego, F. Passarelli, S. Avitabile, C. Scarponi, C. M. Failla, S. Simoni, C. Albanesi and A. Cavani (2015). Interleukin-17 and interleukin-22 promote tumor progression in human nonmelanoma skin cancer.

*European Journal of Immunology* 45(3):922-931.

Negishi, T., Y. Kato, O. Ooneda, J. Mimura, T. Takada, H. Mochizuki, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama and S. Furusako (2005). Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance.

*Journal of Immunology* 175(11):7348-7356.

Ness-Schwickerath, K. J., C. Jin and C. T. Morita (2010). Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells.

*Journal of Immunology* 184(12):7268-7280.

Nogales, K. E., L. C. Zaba, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, T. Kikuchi, M. Ramon, R. Bergman, J. G. Krueger and E. Guttman-Yassky (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells.

*The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(6):1244-1252 e1242.

Orjalo, A. V., D. Bhaumik, B. K. Gengler, G. K. Scott and J. Campisi (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(40):17031-17036.

Ouyang, W., S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez and S. G. Hymowitz (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.

*Annual review of Immunology* 29:71-109.

Park, O., H. Wang, H. Weng, L. Feigenbaum, H. Li, S. Yin, S. H. Ki, S. H. Yoo, S. Dooley, F. S. Wang, H. A. Young and B. Gao (2011). In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression.

*Hepatology* 54(1):252-261.

Pennino, D., P. K. Bhavsar, R. Effner, S. Avitabile, P. Venn, M. Quaranta, V. Marzaioli, L. Cifuentes, S. R. Durham, A. Cavani, K. Eyerich, K. F. Chung, C. B. Schmidt-Weber and S. Eyerich (2013). IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients.

*The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(2):562-570.

- Petanidis, S., D. Anestakis, M. Argyraki, M. Hadzopoulou-Cladaras and A. Salifoglou (2013). Differential expression of IL-17, 22 and 23 in the progression of colorectal cancer in patients with K-ras mutation: Ras signal inhibition and crosstalk with GM-CSF and IFN-gamma. *PloS one* 8(9):e73616.
- Pickert, G., C. Neufert, M. Leppkes, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, H. A. Lehr, S. Hirth, B. Weigmann, S. Wirtz, W. Ouyang, M. F. Neurath and C. Becker (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *Journal of Experimental Medicine* 206(7):1465-1472.
- Qin, S., S. Ma, X. Huang, D. Lu, Y. Zhou and H. Jiang (2014). Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chinese Journal of Cancer Research* 26(2):135-141.
- Qiu, J., J. J. Heller, X. Guo, Z. M. Chen, K. Fish, Y. X. Fu and L. Zhou (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity* 36(1):92-104.
- Radaeva, S., R. Sun, H. N. Pan, F. Hong and B. Gao (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 39(5):1332-1342.
- Rankin, L., J. Groom, L. A. Mielke, C. Seillet and G. T. Belz (2013). Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. *Frontiers in immunology* 4:22.
- Res, P. C., G. Piskin, O. J. de Boer, C. M. van der Loos, P. Teeling, J. D. Bos and M. B. Teunissen (2010). Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PloS one* 5(11):e14108.
- Rider, P., Y. Carmi, O. Guttman, A. Braiman, I. Cohen, E. Voronov, M. R. White, C. A. Dinarello and R. N. Apte (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *Journal of Immunology* 187(9):4835-4843.
- Rutz, S., C. Eidenschenk and W. Ouyang (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews* 252(1):116-132.

Sabat, R., W. Ouyang and K. Wolk (2013). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system.

*Nature Reviews. Drug discovery* 13(1):21-38.

Schulz, S. M., G. Kohler, N. Schutze, J. Knauer, R. K. Straubinger, A. A. Chackerian, E. Witte, K. Wolk, R. Sabat, Y. Iwakura, C. Holscher, U. Muller, R. A. Kastelein and G. Alber (2008). Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17.

*Journal of Immunology* 181(11):7891-7901.

Shalapour, S. and M. Karin (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil.

*Journal of Clinical Investigation* 125(9):3347-3355.

Sherlock, J. P., B. Joyce-Shaikh, S. P. Turner, C. C. Chao, M. Sathe, J. Grein, D. M. Gorman, E. P. Bowman, T. K. McClanahan, J. H. Yearley, G. Eberl, C. D. Buckley, R. A. Kastelein, R. H. Pierce, D. M. Laface and D. J. Cua (2012). IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> entheseal resident T cells.

*Nature Medicine* 18(7):1069-1076.

Simonian, P. L., F. Wehrmann, C. L. Roark, W. K. Born, R. L. O'Brien and A. P. Fontenot (2010).  $\gamma\delta$  T cells protect against lung fibrosis via IL-22.

*Journal of Experimental Medicine* 207(10):2239-2253.

Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser and D. Artis (2011a). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22.

*Nature Immunology* 12(5):383-390.

Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, T. Alenghat, T. C. Fung, N. A. Hutnick, J. Kunisawa, N. Shibata, S. Grunberg, R. Sinha, A. M. Zahm, M. R. Tardif, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. L. Farber, R. G. Collman, A. Shaked, L. A. Fouser, D. B. Weiner, P. A. Tessier, J. R. Friedman, H. Kiyono, F. D. Bushman, K. M. Chang and D. Artis (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria.

*Science* 336(6086):1321-1325.

Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, M. M. Elloso, L. A. Fouser and D. Artis (2011b). CD4<sup>+</sup> lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut.

*Immunity* 34(1):122-134.

- Sonnenberg, G. F., M. G. Nair, T. J. Kirn, C. Zaph, L. A. Fouser and D. Artis (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *Journal of Experimental Medicine* 207(6):1293-1305.
- Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J. P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R. M. Locksley, A. N. McKenzie, R. E. Mebius, F. Powrie and E. Vivier (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 13(2):145-149.
- Sugimoto, K., A. Ogawa, E. Mizoguchi, Y. Shimomura, A. Andoh, A. K. Bhan, R. S. Blumberg, R. J. Xavier and A. Mizoguchi (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation* 118(2):534-544.
- Sung, C. O., S. C. Kim, S. Karnan, K. Karube, H. J. Shin, D. H. Nam, Y. L. Suh, S. H. Kim, J. Y. Kim, S. J. Kim, W. S. Kim, M. Seto and Y. H. Ko (2011). Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 117(4):1291-1300.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle and K. H. Mills (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31(2):331-341.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6):655-669.
- Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, Ivanov, II, D. R. Littman and J. J. O'Shea (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *The Journal of Experimental Medicine* 206(1):35-41.
- Tang, Q., Y. O. Ahn, P. Southern, B. R. Blazar, J. S. Miller and M. R. Verneris (2011). Development of IL-22-producing NK lineage cells from umbilical cord blood hematopoietic stem cells in the absence of secondary lymphoid tissue. *Blood* 117(15):4052-4055.

Taube, C., C. Tertilt, G. Gyulveszi, N. Dehzad, K. Kreymborg, K. Schneeweiss, E. Michel, S. Reuter, J. C. Renauld, D. Arnold-Schild, H. Schild, R. Buhl and B. Becher (2011). IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease. *PloS one* 6(7):e21799.

Thasler, W. E., T. S. Weiss, K. Schillhorn, P. T. Stoll, B. Irrgang and K. W. Jauch (2003). Charitable state-controlled foundation human tissue and cell research: ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in germany. *Cell and tissue banking* 4(1):49-56.

Thompson, C. L., S. J. Plummer, T. C. Tucker, G. Casey and L. Li (2010). Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer causes & control : CCC* 21(8):1165-1170.

Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin and L. H. Glimcher (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20(4):477-494.

Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology* 10(8):864-871.

Van Belle, A. B., M. de Heusch, M. M. Lemaire, E. Hendrickx, G. Warnier, K. Dunussi-Joannopoulos, L. A. Fouser, J. C. Renauld and L. Dumoutier (2012). IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *Journal of Immunology* 188(1):462-469.

Vauhkonen, H., M. Vauhkonen, A. Sajantila, P. Sipponen and S. Knuutila (2006). Characterizing genetically stable and unstable gastric cancers by microsatellites and array comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 170(2):133-139.

Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld and B. Stockinger (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453(7191):106-109.

Voronov, E., S. Dotan, Y. Krelin, X. Song, M. Elkabets, Y. Carmi, P. Rider, C. Idan, M. Romzova, I. Kaplanov and R. N. Apte (2013). Unique versus redundant functions of il-1alpha and il-1beta in the tumor microenvironment.

*Frontiers in Immunology* 4:177.

Waidmann, O., B. Kronenberger, P. Scheiermann, V. Koberle, H. Muhl and A. Piiper (2013). Interleukin 22 serum levels are a negative prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma.

*Hepatology* 59(3):1207.

Walker, J. A., J. L. Barlow and A. N. McKenzie (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them?

*Nature Reviews. Immunology* 13(2):75-87.

Wang, M., Z. Tan, R. Zhang, S. V. Kotenko and P. Liang (2002). Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2.

*The Journal of Biological Chemistry* 277(9):7341-7347.

Wang, Z., L. Yang, Y. Jiang, Z. Q. Ling, Z. Li, Y. Cheng, H. Huang, L. Wang, Y. Pan, Z. Wang, X. Yan and Y. Chen (2011). High fat diet induces formation of spontaneous liposarcoma in mouse adipose tissue with overexpression of interleukin 22.

*PloS one* 6(8):e23737.

Ward, N. L. and D. T. Umetsu (2014). A new player on the psoriasis block: IL-17A- and IL-22-producing innate lymphoid cells.

*The Journal of Investigative Dermatology* 134(9):2305-2307.

Weber, G. F., F. C. Gaertner, W. Erl, K. P. Janssen, B. Blechert, B. Holzmann, H. Weighardt and M. Essler (2006). IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase.

*Journal of Immunology* 177(11):8266-8272.

Wei, C. C., T. W. Ho, W. G. Liang, G. Y. Chen and M. S. Chang (2003). Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein.

*Genes and Immunity* 4(3):204-211.

Wen, Z., Q. Liao, J. Zhao, Y. Hu, L. You, Z. Lu, C. Jia, Y. Wei and Y. Zhao (2014). High expression of interleukin-22 and its receptor predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma.

*Annals of Surgical Oncology* 21(1):125-132.

Wenk, D. (2016). Identifikation von löslichen Tumor-produzierten Faktoren, die Interleukin-22 in murinen Lungen- und Brustkrebsmodellen induzieren.

Department of Clinical Pharmacology, Ludwig-Maximilians-Universität München

Witte, E., K. Witte, K. Warszawska, R. Sabat and K. Wolk (2010). Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection.

*Cytokine & growth factor reviews* 21(5):365-379.

Wolk, K., S. Kunz, K. Asadullah and R. Sabat (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?

*Journal of Immunology* 168(11):5397-5402.

Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah and R. Sabat (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues.

*Immunity* 21(2):241-254.

Wolk, K., E. Witte, U. Hoffmann, W. D. Doecke, S. Endesfelder, K. Asadullah, W. Sterry, H. D. Volk, B. M. Wittig and R. Sabat (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease.

*Journal of Immunology* 178(9):5973-5981.

Wolk, K., E. Witte, E. Wallace, W. D. Doecke, S. Kunz, K. Asadullah, H. D. Volk, W. Sterry and R. Sabat (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis.

*European Journal of Immunology* 36(5):1309-1323.

Wolk, K., E. Witte, K. Witte, K. Warszawska and R. Sabat (2010). Biology of interleukin-22.

*Seminars in Immunopathology* 32(1):17-31.

Xie, M. H., S. Aggarwal, W. H. Ho, J. Foster, Z. Zhang, J. Stinson, W. I. Wood, A. D. Goddard and A. L. Gurney (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R.

*The Journal of Biological Chemistry* 275(40):31335-31339.

Xu, W., S. R. Presnell, J. Parrish-Novak, W. Kindsvogel, S. Jaspers, Z. Chen, S. R. Dillon, Z. Gao, T. Gilbert, K. Madden, S. Schlutsmeyer, L. Yao, T. E. Whitmore, Y. Chandrasekhar, F. J. Grant, M. Maurer, L. Jelinek, H. Storey, T. Brender, A. Hammond, S. Topouzis, C. H.

Clegg and D. C. Foster (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(17):9511-9516.

Xu, X., Y. Tang, S. Guo, Y. Zhang, Y. Tian, B. Ni and H. Wang (2014). Increased Intratumoral Interleukin 22 Levels and Frequencies of Interleukin 22-Producing CD4<sup>+</sup> T Cells Correlate With Pancreatic Cancer Progression.

*Pancreas* 43(3):470-477.

Xue, J., D. T. Nguyen and A. Habtezion (2012). Aryl hydrocarbon receptor regulates pancreatic IL-22 production and protects mice from acute pancreatitis.

*Gastroenterology* 143(6):1670-1680.

Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo and D. A. Hafler (2008a). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.

*Nature* 454(7202):350-352.

Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten and C. Dong (2008b). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.

*Immunity* 28(1):29-39.

Ye, Z. J., Q. Zhou, W. Yin, M. L. Yuan, W. B. Yang, F. Xiang, J. C. Zhang, J. B. Xin, X. Z. Xiong and H. Z. Shi (2012). Interleukin 22-producing CD4<sup>+</sup> T cells in malignant pleural effusion.

*Cancer letters* 326(1):23-32.

Yeste, A., I. D. Mascalfroni, M. Nadeau, E. J. Burns, A. M. Tukpah, A. Santiago, C. Wu, B. Patel, D. Kumar and F. J. Quintana (2014). IL-21 induces IL-22 production in CD4<sup>+</sup> T cells.

*Nature communications* 5:3753.

Yoon, S. I., B. C. Jones, N. J. Logsdon, B. D. Harris, A. Deshpande, S. Radaeva, B. A. Halloran, B. Gao and M. R. Walter (2010). Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain.

*Structure* 18(5):638-648.

Zenewicz, L. A. and R. A. Flavell (2011). Recent advances in IL-22 biology.

*International immunology* 23(3):159-163.



Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, M. Karow and R. A. Flavell (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation.

*Immunity* 27(4):647-659.

Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens and R. A. Flavell (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease.

*Immunity* 29(6):947-957.

Zhang, F., D. Shang, Y. Zhang and Y. Tian (2011). Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway.

*PloS one* 6(5):e20382.

Zhang, W., Y. Chen, H. Wei, C. Zheng, R. Sun, J. Zhang and Z. Tian (2008). Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts.

*Clinical Cancer Research* 14(20):6432-6439.

Zhang, W., X. Tian, F. Mumtahana, J. Jiao, T. Zhang, K. D. Croce, D. Ma, B. Kong and B. Cui (2015). The existence of Th22, pure Th17 and Th1 cells in CIN and Cervical Cancer along with their frequency variation in different stages of cervical cancer.

*BMC Cancer* 15:717.

Zhao, J., Z. Zhang, Y. Luan, Z. Zou, Y. Sun, Y. Li, L. Jin, C. Zhou, J. Fu, B. Gao, Y. Fu and F. S. Wang (2014). Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment.

*Hepatology* 59(4):1331-1342.

Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu and W. Ouyang (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis.

*Nature* 445(7128):648-651.

Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage and W. Ouyang (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.

*Nature Medicine* 14(3):282-289.

Zhuang, Y., L. S. Peng, Y. L. Zhao, Y. Shi, X. H. Mao, G. Guo, W. Chen, X. F. Liu, J. Y. Zhang, T. Liu, P. Luo, P. W. Yu and Q. M. Zou (2012). Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 61(11):1965-1975.

Ziesche, E., M. Bachmann, H. Kleinert, J. Pfeilschifter and H. Muhl (2007). The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells.

*The Journal of Biological Chemistry* 282(22):16006-16015.

Zindl, C. L., J. F. Lai, Y. K. Lee, C. L. Maynard, S. N. Harbour, W. Ouyang, D. D. Chaplin and C. T. Weaver (2013). IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(31):12768-12773.

Zou, W., J. Borvak, F. Marches, S. Wei, P. Galanaud, D. Emilie and T. J. Curiel (2000). Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12.

*Journal of Immunology* 165(8):4388-4396.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

|              |  |
|--------------|--|
| <b>AK</b>    | Antikörper   |
| AhR          | Arylhydrocarbon-Rezeptor                               |
| AP           | Akute Pankreatitis                                     |
| <b>BAL</b>   | Bronchioalveoläre Lavage                               |
| BSA          | Bovines Serum-Albumin                                  |
| <b>Ca.</b>   | Circa  |
| cDNA         | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure                   |
| <b>DC</b>    | Dendritische Zelle                                     |
| DMEM         | <i>Dulbecco's modifies Eagle's medium</i>              |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid                                       |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| DTT          | Dithiothreitol   |
| <b>EDTA</b>  | Ethylendiamintetraessigsäure                           |
| ELISA        | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>               |
| Esodermin    | EOMES  |
| <b>FACS</b>  | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>             |
| FITC         | Fluoresceinisothiocyanat                               |
| FKS          | Fetales Kälberserum                                    |
| FRET         | <i>Fluorescence energy transfer</i>                    |
| FSC          | <i>Forward scatter</i>                                 |
| fwd          | <i>Forward</i>   |
| <b>G-CSF</b> | Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor             |
| <b>HEPES</b> | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HPRT         | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase                 |
| HCl          | Chlorwasserstoff                                       |
| h            | Stunden  |

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>IBD</b>       | <i>Inflammatory bowel disease</i>               |
| <b>IFN</b>       | Interferon                                      |
| <b>Ig</b>        | Immunglobulin                                   |
| <b>IL</b>        | Interleukin                                     |
| <b>IL-10-R2</b>  | Interleukin-10-Rezeptor 2                       |
| <b>IL-22bp</b>   | Interleukin-22-Bindungsprotein                  |
| <b>IL-22-R1</b>  | Interleukin-22-Rezeptor 1                       |
| <b>ILC</b>       | Innate lymphoide Zellen                         |
| <b>iNKT</b>      | invariante NKT-Zellen                           |
| <b>iNK</b>       | immature NK-Zelle                               |
| <b>JAK</b>       | Janus-Kinase                                    |
| <b>kDA</b>       | kilo Dalton                                     |
| <b>LTi</b>       | <i>Lymphoid tissue inducer</i>                  |
| <b>LTi-like</b>  | <i>Lymphoid tissue-like inducer</i>             |
| <b>MAPK</b>      | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>         |
| <b>MDSC</b>      | <i>Myeloid-derived supressor cells</i>          |
| <b>min</b>       | Minute  |
| <b>mRNA</b>      | Messenger ribonucleic acid                      |
| <b>mTOR</b>      | <i>Mammalian target of rapamycin</i>            |
| <b>MUC</b>       | Mucin   |
| <b>NCR</b>       | <i>Natural cytotoxicity triggering receptor</i> |
| <b>n. d.</b>     | Nicht detektierbar                              |
| <b>NEAA</b>      | Nicht-essenzielle Aminosäuren                   |
| <b>NK Zelle</b>  | Neutrophile Killerzelle                         |
| <b>NKT Zelle</b> | Natürliche Killer T-Zelle                       |
| <b>NSCLC</b>     | Nicht-Kleinzelliges-Lungenkarzinom              |
| <b>O</b>         |   |
| <b>PBS</b>       | <i>Phosphate-buffered saline</i>                |
| <b>PBMC</b>      | <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>        |
| <b>PCR</b>       | Polymerase-Kettenreaktion                       |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PE              | Phycoerythrin   |
| PerCP           | <i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>            |
| PI3K            | Phosphoinositid-3-Kinasen                               |
| PMA             | <i>Phorbol-12 myristate-13 acetate</i>                  |
| <b>q</b> RT-PCR | Quantitative <i>real time</i> Polymerase Kettenreaktion |
| <b>RA</b>       | <i>Retinoic acid</i>                                    |
| rev             | <i>Reverse</i>  |
| mRNA            | <i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>                       |
| ROR             | <i>Retinoic acid-related orphan receptor</i>            |
| RPMI-1640       | <i>Roswell Park Memorial Insitute</i>                   |
| RT              | Raumtemperatur  |
| RT-PCR          | Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion         |
| <b>s. c.</b>    | subkutan  |
| SEM             | <i>Standard error of the mean</i>                       |
| SSC             | <i>Side scatter</i>                                     |
| STAT            | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| <b>Tc</b>       | Zytotoxische T-Zellen                                   |
| TGF             | <i>Transforming growth factor</i>                       |
| Th              | T-Helferzelle   |
| TILs            | Tumor infiltrierende Lymphozyten                        |
| TLR             | Toll- <i>like</i> -Rezeptor                             |
| TNF             | Tumor-Nekrose-Faktor                                    |
| TYK2            | Tyrosin-Kinase 2  |
| <b>VEGF</b>     | <i>Vascular endothelial growth factor</i>               |
| <b>WT</b>       | Wildtyp   |

## 7.4 Publikationen

### 7.4.1 Original Publikationen

**1. Voigt C.**, May P., Wenk D., Gottschlich A., Voigt S., Janssen K.-P., Königshoff M., Winter H., Himsl I., Thasler W., Schnurr M., Rothenfusser S., Endres S. and Kobold S. (2016). *submitted*

**2.** Holtorf A, Kistner L., Nitsche U., **C. Ochs**, C. Späth, M. Maak, K.P. Janssen (2012). Prognoseabschätzung und Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentstehung. *Journal Onkologie* 07/2012.

### 7.4.2 Vorträge

**1. Ochs C.** Influence of IL-22 on murine cancer models.  
German-French-Lung-Retreat  
Weißach am Tegernsee, Germany, 2015.

**2. Ochs C.** Influence of IL-22 on murine cancer models.  
CPC Research School Retreat  
Obergurgl, Austria, 2014.

**3. Ochs C.** Influence of IL-22 on murine cancer models.  
German-French-Lung-Retreat  
Tours, France, 2013.

### 7.4.3 Poster Präsentationen

**1. Ochs C.**, May P., Wenk D., Endres S. and Kobold S..  
Impact of Interleukin-22 on two murine models of lung and breast cancer,  
4th European Congress of Immunology, Vienna, 2015, Austria

**2. Ochs C.**, May P., Wenk D., Endres S. and Kobold S..  
Interleukin-22 does not impact methylcholantren-A mediated tumorigenesis.  
CIMT Meeting, 2014, Mainz, Germany

**3.** Keller, L., Doll D., **Ochs C.** and Janssen K.-P..  
CXC-Chemokines as crucial immune mediators in colorectal carcinogenesis.  
V Falk Gastro-Conference: "Carcinogenesis, Prevention and Treatment of Colorectal Cancer - State of the Art 2012", 2012, München, Germany.

## 7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der vergangenen Jahre großartig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen. Bedanken möchte ich mich besonders für seine Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sebastian Kobold für die unglaublich gute Betreuung und immerwährende Unterstützung meiner Arbeit. Ich konnte wirklich viel von deiner Erfahrung profitieren und du hattest immer ein offenes Ohr für Probleme, sowie den perfekten Lösungsansatz parat.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, ein Mitglied meines „Thesis Committee Meetings“ zu werden und somit meine Arbeit extern zu betreuen. Uns verbindet mittlerweile ein etwas längerer wissenschaftlicher Weg und ich bin unglaublich dankbar, dass du dich immer noch so sehr um mich kümmerst.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Melanie Königshoff dafür danken, dass sie mir die Finanzierung meiner Doktorarbeit und die Teilnahme an der CPC Research School ermöglicht hat. Danke für deine tollen Vorschläge in unseren „Thesis Committee Meetings“ und die großartige Unterstützung während meiner Arbeit.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Arbeitskollegen und - Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe Kobold. Vor allem an Vicky, Steffi und Clara: Vielen Dank, für eure großartige Hilfe und Unterstützung (nicht nur wissenschaftlicher Art), die ihr mir während meiner Doktorarbeit gegeben habt. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammenzuarbeiten und auch zusammen feiern oder essen zu gehen. Ein weiterer ganz herzlicher Dank geht an die gesamte Klin-Pharm, vor allem an Laura, Christine und Rachel. Danke, dass ihr mir immer mit allem ausgeholfen habt und wir auch privat so viele schöne Dinge unternommen haben.

Ein sehr großer Dank geht auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit sehr unterstützt haben. Vor allem an Patricia, deren Freundschaft mir sehr wichtig ist. Danke, dass du schon die letzten fünf Jahre während meines Studiums und fast mein ganzes bisheriges Leben für mich da warst. Danke auch an Anja, dass du immer Zeit für mich

hattest und mich auch mal abgelenkt hast. Du bist ein sehr wertvoller und wichtiger Mensch in meinem Leben.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken die mir Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Danke, dass ihr mich immer bei allem unterstützt, mich aufbaut, wenn es meiner Meinung nach schlecht läuft und immer für mich da seid, wenn ich euch brauche. Danke, danke, danke!

Der letzte, aber wichtigste und größte Dank geht an meinen Mann, der mich immer bedingungslos in allem unterstützt und motiviert hat. Danke, dass du auch während den stressigen Phasen meine Launen ertragen hast und mir immer zur Seite standest. Die letzten Jahre mit dir waren die besten meines Lebens und ich freue mich sehr auf unsere gemeinsame Zukunft.



## 7.6 Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name Cornelia Voigt, geb. Ochs

Nationalität: deutsch

### BERUFSERFAHRUNG

---

10/2016 bis heute **Regional Medical Advisor**, Medizinischer Fachbereich Impfstoffe  
GlaxoSmithKline GmbH & Co.KG

03/2016 bis 09/2016 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** (Post-Doc) am Klinikum der  
Universität München, Abteilung für Klinische Pharmakologie

10/2012 bis 02/2016 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** (Doktorandin) am Comprehensive  
Pneumology Center, Helmholtz Zentrum München in Kooperation mit  
der Ludwig-Maximilians-Universität, Abteilung für Klinische  
Pharmakologie  
Dissertation zum Thema: „Interleukin-1-abhängige Interleukin-22-  
Sekretion von T-Helfer Zellen im Bronchial- und Mammakarzinom“

### AUSBILDUNG

---

10/2012 bis 03/2015 **Graduate Student** (mit Auszeichnung)  
Research School for Lung Biology and Disease und HELENA  
Helmholtz Graduate School Environmental Health

09/2009 bis 04/2012 **Masterstudiengang Molekulare Biotechnologie**  
Technische Universität München  
Abschluss: Master of Science, Note: 1,1  
Masterarbeit: „Immunmodulation der Tumorentstehung im Darmtrakt:  
Chemokin-abhängige Rekrutierung von T-Lymphozyten“

10/2006 bis 09/2009 **Bachelorstudiengang Molekulare Biotechnologie**  
Technische Universität München  
Abschluss: Bachelor of Science, Note: 1,5  
Bachelorarbeit: „Collagen induced DDR1 signalling in H292 Cells“

1997 bis 2006 **Abitur/Allgemeine Hochschulreife**  
Albert-Schweitzer-Gymnasium Alsfeld  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5

## Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Interleukin-1-abhängige Interleukin-22-Sekretion von T-Helfer Zellen im Bronchial- und Mammakarzinom**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 24.4.2017

---

Ort, Datum

Cornelia Voigt

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand